

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en el
tratamiento de agua residual urbana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago Nicolás Barreiro Vescovo

Directores

**Mercedes Ballesteros Perdices
Cristina González Fernández
Ignacio de Godos Crespo**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de agua residual urbana

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago Nicolás Barreiro Vescovo

DIRECTORES

Mercedes Ballesteros Perdices

Cristina González Fernández

Ignacio de Godos Crespo

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de microbiología y parasitología



CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSORCIOS MICROALGAS-BACTERIAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL URBANA

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid presentada
por:

Santiago Nicolás Barreiro Vescovo

DIRECTORES

Mercedes Ballesteros Perdices, Cristina González Fernández y

Ignacio de Godos Crespo

Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Energía

Madrid 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20____

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

*“Hay que pensar con el pesimismo de la
razón, pero actuar con el optimismo de la
voluntad”*

Antonio Gramsci (1891-1937)

Memoria presentada por Santiago Nicolás Barreiro Vescovo para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de la Dra. Mercedes Ballesteros Perdices, la Dra. Cristina González Fernández y el Dr. Ignacio de Godos Crespo

Madrid, 2019

Fdo. Santiago Nicolás Barreiro Vescovo

Fdo. Dra. Mercedes Ballesteros Perdices
Jefa de la División de Energías Renovables
CIEMAT

Fdo. Dra. Cristina González Fernández
Jefa de la Unidad de Procesos Biotecnológicos
IMDEA Energía

Fdo. Dr. Ignacio de Godos Crespo
Profesor Ayudante Doctor, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Escuela de Ingeniería de la Industria Forestal, Agronómica y de la Bioenergía,
Campus de Soria
Universidad de Valladolid

Agradecimientos

Antes de comenzar con los agradecimientos me gustaría definir lo que es la gratitud. La Real Academia Española define gratitud como el sentimiento que nos obliga a estimar el beneficio o favor que se nos ha hecho o ha querido hacer, y a corresponder a él de alguna manera. Por lo tanto, quiero reconocer el “beneficio o favor” que se me ha hecho o ha querido hacer.

Una tesis doctoral no solo abarca experimentos, documentos, correcciones, presentaciones y una exposición final. Una tesis doctoral abarca un período de tiempo y unas vivencias que marcan y transforman la vida de una persona. Es justo reconocer que después de casi cuatro años no soy el mismo, o por lo menos no exactamente. He tenido que cambiar, que madurar, que adaptarme a nuevos ambientes a conllevar situaciones difíciles, a reconocer carencias y también virtudes, a trabajar en equipo y a tener que tolerarme. Tengo claro que todo lo que he cambiado y conseguido durante esta etapa no lo hubiese cumplido si no fuera por todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida durante estos odiosos y maravillosos cuatro años. Por lo tanto mi primer agradecimiento quiero dedicárselo a toda esa gente que me ha hecho posible ser lo que soy.

En concreto, a las primeras personas a las que quiero agradecer es a mis directoras Cristina González y Mercedes Ballesteros por haberme abierto la puerta de la Unidad de Biotecnología y de IMDEA. Mi más sincera gratitud por todo el apoyo y el sacrificio de tiempo personal hecho para que pudiese desarrollar mi doctorado en vuestro grupo.

A Ignacio de Godos, mucho más que un director, mucho más que un compañero al que llamar cuando nada parecía salir derecho. Muchas gracias por haber sido un amigo, trabajar contigo y con Merchi es el mejor recuerdo que me llevo de IMDEA.

Imposible olvidarme de toda la gente que ha formado parte de la Unidad de Biotecnología que convirtió la rutina en una alegría. Gracias Elia por haberme tranquilizado en mi primer año que parecía un desierto y también por haberme dado esa mano con las presentaciones. A toda la gente del principio, a Bea, Marie, Ahmed, Isa, Alfredo, Víctor y al Dr. Moreno, gracias por toda esa paciencia y bondad. A Chema por haberme acompañado durante prácticamente toda la tesis, por haber sabido escucharme en los momentos más feos. Y los del final Jose, Quique y Julio por haber sido mi familia imdeana y haber aguantado todas mis bromas de mal gusto. Merchi... no sé cómo hubiera sido mi vida en IMDEA sin ti, pero estoy seguro de que hubiera

sido gris, triste y aburrida, gracias por haberme alegrado tantísimo. Y Lara... creo que nunca voy a poder terminar de agradecer todo lo que me has enseñado dentro y fuera del laboratorio, gracias por haber sido mi amiga, maestra y mentora.

Y por supuesto al resto de compis de IMDEA, los termo-activados Dani, Santi, Sergio, Curro, Héctor, Antonio, Eva, Carmen, Elena, Alba y Patri, me resulta difícil expresar con palabras todo lo que los quiero, sin duda, sin vosotros y vosotras sería otra persona. A Pablo, Sergio, Ana, Álvaro, Iziar, Pedro, Mario, Jaime, David, Albertos, Cleis... hemos sido tantos y tan pocos, gracias todas esas alegrías. Tampoco puedo olvidarme de Rosa, mi Rosa, como te extrañé y como te extraño. Analizando con perspectiva IMDEA tiene muy buenas cosas que destacar, pero lo más importante, sin duda, son las personas que allí se juntan.

Gracias a Federico Navarro, mi tutor durante el doctorado, quién me ayudó con la infernal burocracia del Rapi2 y a entregar documentos en secretaría en mi lugar, que superó con creces su función, facilitándome hasta equipos para mis ensayos de biogás.

A mis amigos Manu y Héctor, hermanos de carrera que a pesar de la distancia siempre estuvieron cerca. Como me hubiese gustado haberos tenido día a día en Madrid. Y como no, a Kyan, Miguel y Ángel, esas amistades que comienzan en Facebook criticando al Estado y al capitalismo y que nunca se sabe que aventuras “unexpected” esconden. Gracias Kyan por la pedazo portada que te has marcado y haber evitado que cayese en el feísmo del Paint.

A Lara Alba, sin su persistencia y constancia nunca hubiese conseguido aplicar en la oferta, entrar en IMDEA y conseguir el doctorado. Gracias por haber sido una gran compañera.

Por último quiero agradecer a mi familia. Empezando por mis abuelos Horacio y Marta por haber sido dos pilares fundamentales a lo largo de mi vida, por haber sido mis segundos padres. Cuanto me hubiese gustado poderlos ver durante la exposición de esta tesis. A mis padres por haberme ayudado tanto y haberme dado una educación admirable en principios y valores, por haber sido mi primer y último refugio, GRACIAS. A Tomi, mi hermano, por ser mucho más que un hermano, por ser también un amigo, por el apoyo que nos damos mutuamente, porque a pesar de ser el hermano menor es un ejemplo de coherencia ética y moral en el que todos deberíamos mirar un poco. Pero lo más bonito que destaco de mi estancia en IMDEA, más allá de la tesis, es una compañera. Gracias Marzia por aparecer, casi al final, sobre la bocina, para escuchar mis lamentos, darme tu apoyo y acompañarme a la distancia durante este final de etapa, gracias por compartir conmigo tu felicidad.

Gracias a todos y a todas por ayudar a que este trabajo viera la luz

Índice

Índice

Agradecimientos.....	I
Índice.....	VI
Resumen.....	IX
Introducción	IX
Objetivos y resultados.....	X
Conclusiones.....	XII
Índice de figuras.....	XIX
Índice de tablas.....	XXIII
Índice de ecuaciones.....	XXIV
Abreviaturas	XXV
1. Justificación de la tesis doctoral y objetivos.....	1
1.1. Justificación de la tesis doctoral.....	1
1.2. Objetivos de la tesis.....	3
2. Introducción.....	7
2.1. Aguas residuales.....	7
2.1.1. Descripción del problema hídrico.....	7
2.1.2. Aguas residuales	11
2.2. Tratamiento convencional de depuración de aguas residuales urbanas	15
2.2.1. Descripción general de los procesos convencionales	15
2.2.2. Valoraciones energéticas y ambientales del tratamiento convencional	21
2.3. Tecnologías alternativas: Tratamiento fotosintético.....	24
2.3.1. Biorreactores empleados en la depuración fotosintética de aguas residuales...25	
2.3.2. Microorganismos fotosintéticos	29
2.3.3. Características biotecnológicas de las microalgas	31
2.3.4. Parámetros que afectan en el tratamiento de agua residual.....	33
2.3.5. Consortios microalgas-bacterias	51
2.4. Aprovechamiento de la biomasa microalga-bacteria.....	57
3. Materiales y métodos.....	63

3.1.	Tratamiento de aguas residuales con consorcios microalgas-bacterias.....	63
3.1.1.	Microorganismos	63
3.1.2.	Cultivo del Inóculo	64
3.1.3.	Sistemas de tratamiento de agua	67
3.1.4.	Métodos analíticos.....	71
3.2.	Modelización de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto (OD)	76
3.2.1.	Producción de oxígeno por las microalgas	76
3.2.2.	Consumo de oxígeno bacteriano	79
3.3.	Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias.....	80
3.3.1.	DGGE	81
3.3.2.	Citometría de flujo (CF)	83
3.3.3.	Secuenciación masiva de ADN MiSeq, Illumina.....	84
4.	Resultados y discusión.....	89
4.1.	Efecto de la proporción microalgas-bacterias del inóculo en discontinuo	89
4.2.	Cultivos de microalgas-bacterias en FBRs semi-continuos	96
4.2.1.	Operación en semi-continuo con un TRH 6 días.....	96
4.2.2.	Tratamiento de agua con TRH de 3 días	102
4.3.	Caracterización de los consorcios vía DGGE y CF	113
4.3.1.	Evolución cualitativa de la población microbiana (DGGE)	114
4.3.2.	Evolución cuantitativa de la población microbiana: Citometría de flujo (CF) ...	122
4.3.3.	Evolución del consorcio: microalgas-bacterias.....	125
4.4.	Caracterización de la actividad microbiana mediante balances de oxígeno.	127
4.4.1.	Evolución en la concentración de oxígeno disuelto (OD).....	128
4.4.2.	Caracterización de la actividad biológica de microalgas	129
4.4.3.	Modelización de la acumulación de oxígeno.....	132
4.5.	Semi-continuo, caracterización de los consorcios vía análisis masivo de ADN y modificación de condiciones	135
4.5.1.	Estudio de la eliminación de nutrientes y materia orgánica	136
4.5.2.	Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en la Fase 1 y 2: secuenciación masiva de ADN	154
5.	Conclusiones.....	173
5.1.	Futuras líneas de investigación	174
	Referencias.....	179

Resumen

Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de agua residual urbana

Introducción

El acusado aumento de la población registrado a nivel global durante las últimas décadas conlleva asociado un aumento en la generación de residuos como es el caso de las aguas residuales urbanas. El vertido de efluentes con alto contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y otros componentes resulta en el proceso de eutrofización: aumento del crecimiento de plantas y algas acuáticas, modificación de la biodiversidad natural del ecosistema, y en los casos más graves la degradación completa de los ecosistemas.

Para reducir los problemas asociados con los vertidos de aguas residuales, en la actualidad, se emplean sistemas de tratamiento basados en sistemas biológicos de fangos activos. En estos sistemas se emplean microorganismos (bacterias aerobias) que necesitan oxígeno para degradar la materia orgánica contenida en el agua residual. A través de una aireación prolongada y la recirculación de fangos activos se eliminan las sustancias contaminantes del agua residual. Mediante aireación y agitación se suministra el oxígeno necesario para que los microorganismos puedan llevar a cabo su actividad biológica de degradaciones de contaminantes. El proceso de aireación de los tanques aerobios en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) puede llegar a suponer entre el 45 y el 75% de los gastos energéticos totales del proceso de depuración. Este coste se incrementa en poblaciones de pequeño tamaño y zonas con déficit hídrico. Además, se trata de sistemas que producen emisiones de gases de efecto invernadero y que presentan una baja recuperación de nitrógeno y fósforo.

Una alternativa a los procesos convencionales basados en fangos activos es la utilización de consorcios de microalgas y bacterias. Estos sistemas mixtos pueden contribuir a reducir los gastos energéticos de las EDAR, reduciendo los costes de aireación de los tanques, gracias al metabolismo fotosintético de las microalgas que producen in situ el oxígeno requerido por las

bacterias para la eliminación de contaminantes. Además, la depuración de aguas residuales con estos consorcios permite eliminar en una sola etapa tanto la materia orgánica, como el nitrógeno y el fósforo, presentes en el agua residual hasta niveles aptos para su vertido. Igualmente el empleo de estos consorcios contribuye a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) debido a la asimilación de CO₂ por parte de las microalgas. La recuperación de los nutrientes contenidos en el agua residual hace que este proceso basado en microalgas sea más sostenible, dado que la biomasa producida puede revalorizarse de diferentes formas.

Sin embargo, para que esta tecnología sea más aceptada para su aplicación comercial es necesario optimizarla y validarla en condiciones reales de operación bajo los estándares industriales, profundizando en el conocimiento de las relaciones que se establecen en los consorcios formados entre microalgas y bacterias y estableciendo las variaciones de las poblaciones microbianas a lo largo del proceso de depuración.

Objetivos y resultados

La presente tesis doctoral tiene como objetivo estudiar la depuración de las aguas residuales urbanas empleando consorcios formados por microalgas-bacterias, centrándose en las relaciones que se establecen entre los dos grupos de microorganismos. Para ello, y como primera aproximación, se han realizado experimentos para la determinación de las proporciones óptimas de microalgas/bacterias de los inóculos en fotobiorreactores (FBRs) operados en *batch*. En estos ensayos se emplearon como inóculo de microalgas una mezcla de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* y como inóculo bacteriano fango activo de la depuradora de Castellón de la Plana. La reducción de la concentración de nitrógeno amoniacal en las primeras 24 h del proceso en todos los ensayos osciló entre el 53 y el 58% y la de materia orgánica (DQO_s) entre el 77 y el 86% y no se observaron diferencias al utilizar inóculos con diferentes proporciones de microalga/bacteria. En estos ensayos se detectó la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), medida indirectamente a través del incremento de la DQO_s, que incrementaron el contenido de materia orgánica en los FBRs cuando las bacterias no fueron incluidas en consorcio.

Posteriormente, para la caracterización poblacional y de la relación que se establece entre microalgas y bacterias en términos de intercambio de oxígeno (balance entre la producción y el consumo de oxígeno), se realizaron ensayos en semi-continuo empleando FBRs operados con TRH de 6 y 3 días. Como primera aproximación a la operación en régimen semi-continuo se

realizó un ensayo con un TRH de 6 días. La eliminación de materia orgánica fue incompleta lo que condujo a una eliminación de DQO₅ del 30%. Los resultados obtenidos señalaron la necesidad de caracterizar la fracción biodegradable de la DQO₅ del influente en los futuros ensayos. Además, estos resultados, indican un posible escaso contenido en microorganismos eliminadores de materia orgánica. La eliminación de nitrógeno total también fue incompleta (57%) debido a la operación cerrada a la atmósfera. La eliminación de fósforo del 88% permitió obtener efluentes con una reducida carga de este compuesto como ocurrió en los futuros ensayos.

En los experimentos realizados con un TRH de 3 d se utilizó como inóculo una cepa de *C. sorokiniana* aislada de la EDAR de Castellón de la Plana y fango activo de la misma depuradora. En estos ensayos se estudió la evolución de las poblaciones de microalgas-bacterias mediante métodos cualitativos/cuantitativos de biología molecular y de biología celular: PCR-DGGE, citometría de flujo y análisis masivo de ADN (Plataforma Illumina MiSeq). Además, se determinó la actividad microbiana estudiando la evolución del contenido en oxígeno durante el proceso de depuración.

En los FBRs operados en semi-continuo con TRH de 3 días se obtuvieron bajas eliminaciones de materia orgánica (DQO₅ 36%). Teniendo en cuenta la fracción biodegradable de la materia orgánica del influente el porcentaje de eliminación de DQO₅ fue superior, pero incompleto (64%). Este hecho estuvo relacionado con la ausencia de microorganismos oxidadores de compuestos orgánicos, tal y como fue puesto en evidencia con la identificación mediante DGGE. En estos experimentos se observó la dominancia en el consorcio de bacterias púrpuras fotótrofas (realizadores de la fotosíntesis anoxigénica) de la familia *Rhodobacteraceae* (56-74%). Estos grupos de organismos se caracterizan por consumir un rango limitado de sustratos como fuente de carbono, por lo que no fueron muy eficientes en la eliminación de la fracción biodegradable de la DQO₅. La eliminación de nitrógeno fue también incompleta (NT 71%) debido al método de operación cerrado a la atmósfera que dificultó la volatilización del N-NH₃. La eliminación del fósforo del 68% permitió obtener efluentes con reducidas concentraciones (1 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹).

A partir de los valores de la evolución de la concentración de OD durante los ensayos en semi-continuo, se desarrolló un modelo capaz de reflejar las tasas de actividad de las microalgas y las bacterias durante la depuración. El modelo, basado en ecuaciones validadas anteriormente por otros autores para la determinación de la actividad metabólica de microalgas y bacterias por separado, permite predecir, con un elevado nivel de ajuste, las concentraciones de OD durante

la fase lumínica del proceso. Sin embargo, no pudo predecir el elevado consumo de OD por el consorcio durante la fase oscura.

Dado que los experimentos en semi-continuo demostraron la importancia que el desarrollo del consorcio microbiano tiene sobre el proceso de depuración de aguas, se realizó un nuevo experimento en semi-continuo con un THR de 3 días empleando una técnica de identificación más robusta y precisa, como el análisis masivo de ADN (Plataforma Illumina MiSeq). Este experimento fue usado también para evaluar el efecto del contacto con la atmósfera usando dos modos de operación con FBRs en cerrado y abierto.

La eliminación de la materia orgánica (DQO_s) fue del 46-48%, en cambio, la eliminación de la fracción biodegradable de la DQO_s fue de 86-88%, indicando una posible composición distinta de las poblaciones desarrolladas en el consorcio microalgas-bacterias en comparación con la de los FBRs cerrados anteriores. En comparación con el ensayo previo, a pesar de las diferentes metodologías empleadas para la identificación, el análisis masivo de ADN demostró un cambio significativo en las poblaciones desarrolladas en el presente ensayo. Las bacterias dominantes fueron en este caso *γ-Proteobacteria: Pseudomonas* (8-38%) y *Acinetobacter* (23-54%). *Desmodesmus multivariabilis* (88-97%) fue la especie de microalgas más abundante durante el tratamiento. La composición de este consorcio fue más adecuada y eficiente en la oxidación de DQO_s biodegradable. La diferencia en los niveles de eliminación de NT fue 35% durante la fase de operación cerrada frente a 97% en la fase abierta. El porcentaje de eliminación del fósforo en este ensayo fue superior al 89% obteniéndose efluentes con una reducida carga de este componente (0,4 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹).

Conclusiones

Como consecuencia de los resultados obtenidos puede concluirse que, el empleo de sistemas mixtos formados por microalgas-bacterias permite depurar las aguas residuales de manera efectiva, obteniéndose efluentes que cumplen los parámetros de vertido requeridos por la legislación más restrictiva de aguas residuales tratadas.

Para la correcta depuración en el sistema de cultivo deben darse las condiciones adecuadas para que se desarrollen consorcios compuestos tanto de fotótrofos oxigénicos como de heterótrofos aerobios. Estas condiciones no siempre prevalecen dado que en situaciones donde la concentración de oxígeno supera los 17 mg L⁻¹, el consorcio puede estar formado

exclusivamente por fotótrofos tanto oxigénicos como anoxigénicos. Aunque dentro de este último grupo hay organismos eliminadores de materia orgánica, no proporcionan los niveles adecuados para obtener descargas conformes a los requisitos legales más exigentes.

El estudio de la determinación de actividad microbiana mediante aplicación de modelos que describen los niveles de OD, demuestran que la relación entre microalgas y bacterias no se limita al consumo bacteriano del oxígeno producido fotosintéticamente por las microalgas, sino que una importante cantidad de este oxígeno es consumido por las propias microalgas a través de la respiración endógena y fotorrespiración.

Abstract

Characterization of microalgae-bacteria consortia in urban wastewater treatment

Introduction

The sharp increase in the global population registered during the last decades entails an associated increase in the generation of waste as a consequence of human activity, such as urban wastewater. The emissions of effluents with a high content in organic matter, nitrogen, phosphorus, and other components result in the eutrophication process: increased growth of aquatic plants and algae, modification of the ecosystem natural biodiversity, and, in the most severe cases, the complete ecosystem degradation.

In order to reduce the problems associated with wastewater discharges, currently, treatment systems based on biological systems of activated sludge are employed. In these systems, microorganisms (aerobic bacteria) require oxygen to degrade the organic matter contained in the wastewater. By means of prolonged aeration and recirculation of activated sludge, pollutants are removed from the wastewater. The required oxygen is supplied through aeration and agitation to allow microorganism's biological pollutants degradation. The aeration process of aerobic tanks in wastewater treatment plants (WWTP) can reach between 45 and 75% of total energy process demand. This cost increases in small populations and areas with water deficit. In addition, these systems produce greenhouse gas emissions and present low recycling of nitrogen and phosphorus.

The employment of microalgae-bacteria consortia is an alternative for conventional wastewater treatment based on activated sludge technology. These mixed systems can contribute to reducing the WWTP energetic cost by diminishing the aeration through microalgae photosynthetic activity. *In situ* oxygen production of microalgae is used by the heterotrophic metabolism of bacteria for pollutants removal. Furthermore, wastewater treatment through microalgae-bacteria consortia enables to remove organic matter, nitrogen and phosphorous until effluent discharge suitability in one single step. In addition, these consortia contribute to mitigate greenhouse gas emissions because of the microalgae assimilation of CO₂. The recovery

of wastewater nutrients makes microalgae based processes more sustainable than conventional treatments since biomass can be revalorized through different alternatives.

However, it is necessary to optimize and validate this technology in real operating conditions, furthering the knowledge in the relationships established in the consortia formed between microalgae and bacteria and establishing the variations of microbial populations throughout the treatment process.

Objectives and results

This Thesis aims to study the wastewater treatment employing microalgae-bacteria consortia, focusing on the interactions established between microorganisms. To this effect, as a first approach, enclosed batch cultures were conducted to determine the optimum ratio of microalgae/bacteria inoculum in photobioreactors (PBRs). In these assays, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* as microalgae inoculum and activated sludge as bacteria inoculum from Castellon de La Plana treatment plant were used. During the first 24 h, ammonium removal ranged 53-58% and organic matter (COD_s) ranged 77-86%. No differences were found in terms of organic matter and nitrogen removal in mixed cultures with different inoculum proportion of microalgae/bacteria. Extracellular polymeric substances (EPS) were indirectly detected through the increases of COD_s. These EPS raised the organic matter content in the cultures when bacteria were not included in the consortia.

Hereinafter, semicontinuous cultures were carried out in PBR with a hydraulic retention time (HRT) of 6 and 3 days for the characterization of populations and the interaction of microalgae-bacteria in terms of oxygen exchange. As a first approach of the semi-continuous operation an HRT of 6 days assay was carried out. The organic matter removal conducted to an incomplete elimination of COD_s (30%). These results pointed out the need to characterize the biodegradable COD_s fraction from the influent in the future experiments. This result also suggested a limited presence of microorganisms in charge of organic matter removal. Total nitrogen elimination was also incomplete (57%) due to the atmosphere enclosed operation. Phosphorous removal percentage of 88% allowed an effluent with reduced P concentration.

The cultures developed with HRT of 3 days were inoculated with activated sludge and a strain of *C. sorokiniana*, both collected from Castellón de La Plana WWTP. The microalgae-bacteria inoculum ratio was 25% of microalgae and 75% of activated sludge. In these assays,

microalgae-bacteria populations were analyzed through qualitative and quantitative methods of molecular biology and cellular biology: PCR-DGGE, Flow Cytometry and Massive Analysis (Illumina MiSeq Platform). Furthermore, microbial activity was determined by means the dissolved oxygen (DO) evolution during the wastewater treatment.

Organic matter removal in PBRs operated under HRT conditions of 3 days was low (COD_s removal 36%). Considering the influent biodegradable fraction of the organic matter, COD_s removal was higher, but incomplete (64%). The low organic matter removal was promoted by the absence of oxidative microorganisms of organic compounds, as evidenced by DGGE identification. In these experiments, the dominance of photoorganotrophic bacteria (anoxygenic photosynthesis) belonging to *Rhodobacteraceae* family (56-74%) was observed. These groups of microorganisms are characterized to consume a limited range of substrates as a carbon source, consequently, they were not efficient in biodegradable COD_s fraction removal. Due to the enclosed operation, which hampered ammonia volatilization, total nitrogen removal was also incomplete (NT removal = 71%). Phosphorous removal of 68% led to effluents with low P concentrations (1 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹, similar to HRT= 3 d operation).

A dissolved oxygen model was developed from the oxygen concentration evolution registered over the semi-continuous operation (HRT= 3 d). This model was able to reflect the microalgae and bacteria activity rate across the treatment. This model was based on previously validated equations by other authors for the oxygen production/consumption determination for microalgae and heterotrophic bacteria, respectively. The model allowed to predict accurately DO concentration during the light phase of the process. Nevertheless, the model was not able to predict the high oxygen consumption during the dark phase.

Given the relevance of the consortia development in the wastewater treatment in the semi-continuous experiments, a new assay operated with HRT 3 d was conducted. In this case, a stronger and more accurate technique was employed. For the identification of populations, massive DNA analysis (MiSeq Illumina Platform) was used. The atmosphere contact effect was also studied in this experiment by operating open and enclosed PBR.

Organic matter elimination (DQO_s) was around 46-48%, in contrast, biodegradable fraction of DQO_s removal increased to 86%, pointing out that a different population consortia was present in this assay when compared with the previous one. In contrast with the previous HRT 3 d assay, in spite of the employment of different methodology for the identification of dominant populations, the DNA massive analysis demonstrated a significant shift in the developed population. In this case, dominant bacterial population belonged to *γ-Proteobacteria*:

Pseudomonas (8-38%) and *Acinetobacter* (23-54%) whereas *Desmodesmus multivariabilis* (88-97%) was the microalga specie most abundant during the treatment. The microalgae-bacteria composition was more suitable and efficient for biodegradable COD₅ oxidation. The enclosed operation led once again to incomplete total nitrogen (TN) removal of 35% while the open to the atmosphere PRB reached 97%. Phosphorous percentage removal was 88%. This elimination resulted in a reduced P concentration in the effluents (0,4 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹).

Conclusions

As a result of the experiments developed during this Thesis, it can be concluded that the employment of mixed systems composed by microalgae-bacteria consortia allowed an effective wastewater treatment, obtaining effluents in the range of the most restrictive legislation.

To achieve an efficient wastewater treatment, appropriate conditions must be given for the proper development of oxygenic phototrophs and aerobic heterotrophs. These conditions do not always prevail. For instance, when DO concentration exceeds 17 mg L⁻¹, the consortia can be comprised exclusively by both oxygenic and anoxygenic phototrophs. Although in this group there are microorganisms able to remove organic matter, they do not provide adequate organic matter levels to obtain effluents for suitable discharge in sensitive areas.

The study dealing with the microbial activity determination by applying a DO model showed that the relationship between microalgae and bacteria was not limited to bacterial consumption of oxygen produced photosynthetically by microalgae. A significant amount of this oxygen is consumed by the microalgae itself through endogenous respiration and photorespiration.

Índice de figuras

Figura 2.1. Cumplimiento de los índices legales de descarga de las EDAR españolas.....	14
Figura 2.2. Esquema de las relaciones entre las microalgas y bacterias durante el proceso de tratamiento de agua residual.....	23
Figura 2.3. A) Esquema de un FBR cerrado tubular. B) Ejemplo de un FBR tubular de las instalaciones de Las Palmerillas, Almería.....	26
Figura 2.4. A) Esquema de un FBR abierto tipo <i>raceway</i> . B) Ejemplo de un reactor abierto tipo <i>raceway</i> , Chiclana de La Frontera, Cádiz.....	27
Figura 2.5. Ejemplos de la diversidad de microalgas.....	30
Figura 2.6. Esquema de las implicaciones de los parámetros de cultivo de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de las aguas residuales.....	34
Figura 2.7. Equilibrio de H_2CO_3 , HCO_3^- y CO_3^{2-} en función del pH.....	36
Figura 2.8. Esquema simplificado de la asimilación de N inorgánico.....	37
Figura 2.9. Equilibrio de NH_3 y NH_4^+ en función del pH.....	38
Figura 2.10. Equilibrio de H_3PO_4 , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} en función del pH.....	39
Figura 2.11. Ejemplo de los rangos de temperatura de crecimiento de algunas microalgas.....	42
Figura 2.12. Ejemplo de la variación diurna de temperatura en FBRs tipo <i>raceway</i>	43
Figura 2.13. Relación típica entre la intensidad lumínica y la velocidad fotosintética.....	44
Figura 2.14. Diagrama de la determinación de la intensidad lumínica en un punto determinado de un FBR cilíndrico.....	46
Figura 2.15. Respuesta fotosintética frente a la intensidad solar obtenida a partir de los datos promediados con algas plantónicas marinas.....	47
Figura 2.16. Intensidad solar y producción de OD en reactores abiertos a lo largo de 5 días consecutivos.....	51
Figura 2.17. Esquema-resumen de las posibles interacciones entre microalgas y bacterias.....	52
Figura 3.1. Ejemplo del consorcio microalgas-bacterias.....	64
Figura 3.2. Cultivos de microalgas-bacterias en FBRs de 1 L empleados para el tratamiento de aguas residuales urbanas.....	69
Figura 3.3. Resumen de ensayos realizados para la caracterización de la simbiosis microbiana y su funcionamiento en el modo de operación semi-continuo (TRH 3 d).....	70
Figura 3.4. Obtención de las diferentes intensidades lumínicas requeridas para la caracterización de la respuesta de producción de oxígeno de los consorcios.....	78
Figura 3.5. Ejemplo de una gráfica de rarefacción para el análisis de la precisión de la caracterización.....	85

Figura 4.1. Evolución de las concentraciones de DQO ₅ y en los ensayos en <i>batch</i> .	90
Figura 4.2. Evolución de las concentraciones de N-NH ₄ ⁺ y en los ensayos en <i>batch</i> .	92
Figura 4.3. Evolución de las concentraciones de SSV en los ensayos en <i>batch</i> .	94
Figura 4.4. Evolución de las concentraciones de OD y pH en los ensayos en <i>batch</i> .	95
Figura 4.5. Evolución de la DQO durante la operación en FBRs con TRH de 6 d.	97
Figura 4.6. Evolución del OD durante la operación en FBRs con TRH de 6 d.	98
Figura 4.7. Evolución del N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ ⁻ y N-NO ₃ ⁻ y NT durante la operación en FBRs con TRH de 6 d.	99
Figura 4.8. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno durante la operación en semi-continuo con TRH de 6 d.	100
Figura 4.9. Evolución del pH medido de manera puntual durante la operación en FBRs con TRH de 6 d.	101
Figura 4.10. Evolución de la biomasa, SSV, durante la operación en FBRs con TRH de 6 d.	101
Figura 4.11. Evolución del P-PO ₄ ³⁻ durante la operación en FBRs con TRH de 6 d.	102
Figura 4.12. Evolución de la DQO durante la operación en FBRs con TRH de 3 d.	105
Figura 4.13. Ensayo de biodegradabilidad de una muestra del lote 3.	106
Figura 4.14. Evolución de la concentración de N-NH ₄ ⁺ durante la operación en FBRs con TRH de 3 d.	107
Figura 4.15. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno durante la operación en semi-continuo con TRH de 3 d y TRH de 6 d.	109
Figura 4.16. Evolución de la biomasa, SSV, durante la operación en FBRs con TRH de 3 d y TRH de 6 d.	110
Figura 4.17. Evolución del pH, HCO ₃ ⁻ y CO ₃ ²⁻ en el FBR operado con TRH de 3 d. Los períodos de alimentación se reflejan con la línea discontinua vertical.	111
Figura 4.18. Evolución de la concentración de P-PO ₄ ³⁻ durante la operación en FBRs con TRH de 3 d. La línea discontinua gris oscura representa la concentración en el influente.	113
Figura 4.19. Gel electroforético desnaturalizante (DGGE) para organismos eucariotas.	115
Figura 4.20. Gel electroforético desnaturalizante (DGGE) para organismos procariotas.	117
Figura 4.21. Distribución de los microorganismos atendiendo al reino de pertenencia a lo largo de la operación en semi-continuo con TRH de 3 d.	123
Figura 4.22. Distribución de los microorganismos procariotas en función de la presencia ausencia de los pigmentos fotosintéticos.	125
Figura 4.23. Esquema de las relaciones entre las microalgas y las bacterias fotoorganotrofas encontradas en los FBRs operados con TRH de 3 días.	127

Figura 4.24. Evolución del OD durante dos días consecutivos (12-13) de operación con TRH de 3 d.	129
Figura 4.25. Influencia de la intensidad lumínica en la velocidad de producción de oxígeno de la biomasa de microalgas-bacterias	130
Figura 4.26. Valores simulados de la evolución de OD considerando cada uno de los bioprocesos	134
Figura 4.27. Esquema de la operación con TRH de 3 d, dividida en: Fase 1 y Fase 2.	136
Figura 4.28. Evolución de la DQO durante la operación con TRH de 3 d (Fase 1) y test de biodegradabilidad.	138
Figura 4.29. Evolución del $N-NH_4^+$ durante la operación en semi-continuo TRH de 3 días (Fase 1).	139
Figura 4.30. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno durante la operación en semi-continuo con TRH de 3 d-Fase 1, TRH de 3 d y TRH de 6 d.....	141
Figura 4.31. Evolución de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) durante la operación con TRH de 3 d (Fase 1).....	142
Figura 4.32. Evolución de la concentración de Cl y del pH durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1.	143
Figura 4.33. Evolución del OD durante dos días consecutivos de cultivo operados con TRH de 3 d	144
Figura 4.34. Eliminación del $P-PO_4^{3-}$ durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1.	146
Figura 4.35. Esquema del muestreo durante la Fase 2 de operación de los FBRs.	147
Figura 4.36. Evolución de la eliminación de DQO durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1 y Fase 2	149
Figura 4.37. Evolución de la concentración de $N-NH_4^+$ durante la operación con TRH de 3 d-Fase y Fase 2 (FBR A, Cerrado y FBR B, Abierto).....	151
Figura 4.38. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno durante la operación en semi-continuo con TRH de 3 d durante la Fase 1 y la Fase 2	152
Figura 4.39. Evolución de la concentración de biomasa (SSV) durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1 y Fase 2 (FBR A, Cerrado y FBR B, Abierto).....	154
Figura 4.40. Curvas de rarefacción obtenidas del análisis de las especies de microalgas de las muestras: t0, t41, t57 a y b.	156
Figura 4.41. Evolución del índice Shannon-Wiener para las poblaciones de microalgas en las muestras: t0, t41, t57 a y b.	157
Figura 4.42. Abundancia de las distintas especies de microalgas presentes en las muestras correspondientes a los días 0, 41 y 57.	159

Figura 4.43. Curvas de rarefacción obtenidas del análisis de géneros procariotas de las muestras: 0, 41, 57 <i>a</i> y <i>b</i>	160
Figura 4.44. Evolución del índice Shannon-Wiener para las poblaciones de bacterias en las muestras t0, t41 y t57 <i>a</i> y <i>b</i>	162
Figura 4.45. Evolución de los filos-clases de bacterias en las muestras: t0, t41, t57 <i>a</i> y <i>b</i>	163
Figura 4.46. Evolución los géneros bacterianos en las muestras: t0, t41, t57 <i>a</i> y <i>b</i>	166

Índice de tablas

Tabla 2.1. Población europea por países conectada a los sistemas de tratamiento de aguas residuales, aguas residuales urbanas generadas y volumen que recibe tratamiento.....	9
Tabla 2.2. Características físico-químicas de las aguas residuales urbanas.....	12
Tabla 2.3. Parámetros, concentraciones máximas permitidas o porcentaje de eliminación exigidos por la legislación europea y española referente al tratamiento de aguas residuales urbanas con vertido a zonas sensibles.....	13
Tabla 2.4. Emisiones de GEI procedentes del tratamiento de agua residual.....	23
Tabla 2.5. Características metabólicas y fisiológicas de los microorganismos involucrados en el proceso de tratamiento de aguas basado en los consorcios microalgas-bacterias	41
Tabla 3.1. Soluciones stock para preparar el medio de cultivo Bold basal modificado.....	66
Tabla 3.2. Composición de las aguas residuales empleadas como influentes	67
Tabla 4.1. Eliminación de nitrógeno en los FBRs A-B-C-D	92
Tabla 4.2. Concentración de DQO ₅ en los influentes, en los efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d.....	104
Tabla 4.3. Concentraciones de N-NH ₄ ⁺ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación en los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d.....	108
Tabla 4.4. Comparativa entre las concentraciones de P-PO ₄ ³⁻ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d	112
Tabla 4.5. Bandas identificadas del gel electroforético desnaturalizante eucariota.....	116
Tabla 4.6. Bandas identificadas del gel electroforético desnaturalizante procariota	121
Tabla 4.7. Concentración de DQO ₅ en los influentes, los efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y TRH de 3 d (Fase 1).....	138
Tabla 4.8. Comparativa entre las concentraciones de N-NH ₄ ⁺ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y TRH de 3 d (Fase 1) ...	140
Tabla 4.9. Comparativa entre las concentraciones de P-PO ₄ ³⁻ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y TRH de 3 d (Fase 1) ...	146
Tabla 4.10. Comparativa entre las concentraciones de DQO ₅ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación en los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y durante la Fase 1 y 2.	148
Tabla 4.11. Comparativa entre las concentraciones de N-NH ₄ ⁺ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y durante la Fase 1 y 2.	151
Tabla 4.12. Resultado del análisis masivo de ADN	156

Índice de ecuaciones

Ecuación 2.1. Velocidad específica de la fotosíntesis con un modelo tipo Monod.	45
Ecuación 2.2. Modelo propuesto por Molina-Grima	45
Ecuación 2.3. Adaptación de la ley de Lambert-Beer para promediar la intensidad lumínica en un medio líquido.....	46
Ecuación 2.4. Modelo propuesto por Aiba <i>et al.</i> que incorpora la inhibición por efecto de la intensidad lumínica.....	47
Ecuación 2.5. Adaptación de la Ecuación 2.2 incorporando el efecto de la inhibición por intensidad lumínica.....	47
Ecuación 2.6. Determinación de la velocidad de producción de azúcares según Blanket <i>et al.</i> ..	48
Ecuación 2.7. Ecuación para determinar el efecto inhibitorio del oxígeno en la reacción de carboxilación según Aiba <i>et al.</i>	49
Ecuación 2.8. Determinación del efecto inhibitorio del producto de la reacción de Hill (O_2)	50
Ecuación 3.1. Fórmula empleada para determinar el porcentaje de nitrógeno de las muestras biológicas.....	73
Ecuación 3.2. Determinación de la volatilización del N	74
Ecuación 3.3. Fórmula empleada para la determinación del porcentaje de NH_3	74
Ecuación 3.4. Determinación de la alcalinidad equivalente en $CaCO_3$	74
Ecuación 3.5. Determinación de la concentración de HCO_3^-	75
Ecuación 3.6. Determinación de la concentración de CO_3^{2-}	75
Ecuación 3.7. Determinación del CO_2 libre.....	75
Ecuación 3.8. Determinación de la concentración de carbono inorgánico eq CO_2	76
Ecuación 3.9. Balance de acumulación de oxígeno	76
Ecuación 3.10. Determinación para realizar el ajuste de mínimos cuadrados.....	78
Ecuación 3.11. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno.	79
Ecuación 3.12. Determinación de la velocidad de utilización de sustratos solubles	79
Ecuación 3.13. Determinación de la velocidad de crecimiento de la biomasa heterótrofa	80
Ecuación 3.14. Determinación de la biomasa aerobia.....	80

Abreviaturas

SST: Sólidos suspendidos totales	DGGE: <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> , electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
SSV: Sólidos suspendidos volátiles	CF: Citometría de flujo
ST: Sólidos totales	RO ₂ : Tasa de producción de oxígeno
SV: Sólidos volátiles	I _{av} : Intensidad lumínica media
DBO: Demanda biológica de oxígeno	I _K : Intensidad lumínica media de saturación
DQO: Demanda química de oxígeno	I _i : Intensidad lumínica de inhibición
DQO _s : Demanda química de oxígeno soluble	R _{US} : Tasa de consumo de sustratos solubles (DQO _s)
DQO _T : Demanda química de oxígeno total	R _{GB} : Tasa de crecimiento de biomasa heterótrofa
COT: Carbono orgánico total	X: Concentración de biomasa
CI: Carbono inorgánico	Y: Rendimiento de generación de biomasa
NTK: Nitrógeno Kjeldahl total	
PT: Fósforo total	
NT: Nitrógeno total	
FBR: Fotobiorreactor	
SPE: Sustancias poliméricas extracelulares	
TRH: Tiempo de residencia hidráulico	
TRS: Tiempo de retención de sólidos	
OAF: Organismos acumuladores de fosfato	
GEI: Gases de efecto invernadero	
HRAP: <i>High Rate Algal Pond</i>	
RuBisCO: ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa oxigenasa	
RuBP: Rubulosa-1,5-bisfosfato	
OD: Oxígeno disuelto	
PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en Cadena de la Polimerasa	

1. Justificación y objetivos

1. Justificación de la tesis doctoral y objetivos

1.1. Justificación de la tesis doctoral

El incremento en un 80% de la población mundial desde 1980 ha provocado un aumento de las aguas residuales generadas como consecuencia de las actividades humanas [1]. Naciones Unidas prevé en las próximas décadas un aumento en la población sin precedentes que llevará aparejado un aumento muy significativo en la generación de aguas residuales con consecuencias nocivas sobre los ecosistemas, la salud humana y las actividades económicas si no se tratan de manera adecuada [2].

Para paliar los efectos no deseados del vertido de aguas residuales en cauces naturales se utilizan sistemas de tratamiento que normalmente están basados en la tecnología de “fangos activos”. Éstos permiten obtener efluentes con cargas de contaminantes por debajo de los requeridos por la legislación europea (Directivas 91/271/CEE y 98/15/CE del Consejo Europeo).

Los procesos de depuración utilizados actualmente, para obtener una calidad apropiada de los efluentes antes de su vertido, requieren sistemas de tratamiento que consumen altas cantidades de energía (0,49-0,72 KWh m⁻³). El gasto energético de estos tratamientos de fangos activos puede suponer entre 45-75% de los gastos totales de una estación depuradora de agua residual (EDAR) [3, 4] y, en consecuencia, el tratamiento de aguas supone un considerable porcentaje de la demanda energética mundial, que se estima entre el 1 y el 3% del consumo global [5]. El alto gasto energético está asociado al suministro de aire necesario para garantizar la cantidad de oxígeno suficiente para que las bacterias aerobias, mediante oxidación biológica, eliminen los contaminantes contenidos en el agua residual.

Adicionalmente, los costes del tratamiento convencional aumentan exponencialmente cuanto menor es el tamaño de la planta y menor es la población a la que dan servicio. Por ello, muchas poblaciones de tamaño inferior a los 15.000 habitantes no puedan hacer frente a los gastos que supone la depuración de sus aguas residuales, y los efluentes generados son vertidos sin el tratamiento adecuado [1].

España cuenta con el 10,6% de su población en núcleos poblacionales de 10.000-20.000 habitantes. Esto implica que 4,9 millones de habitantes deben pagar un coste elevado por la depuración de sus aguas residuales o las viertan sin el adecuado tratamiento [6]. En España, el 16% de las aguas que se devuelven a los cauces naturales no cumplen con los requisitos legales

Europeos de calidad de los vertidos [4]. Esto ha sido motivo de diversos procesos sancionadores por parte de las instituciones europeas al Estado español en las últimas décadas, motivo por el cual las instituciones públicas están obligadas a tomar medidas para solucionar este problema.

Además, de su elevado coste energético, los sistemas convencionales basados en los fangos activos son muy ineficientes en el reciclaje/recuperación de nitrógeno (N) y fósforo (P), puesto que su eliminación está basada en procesos desasimilativos como la desnitrificación en forma de N_2 y la precipitación química del P.

Tanto el N como el P son componentes esenciales de los fertilizantes químicos empleados en la agricultura y su fabricación tiene importantes consecuencias económicas, energéticas y ambientales. La fabricación del amoníaco, principal fuente de N de los fertilizantes, puede llegar a consumir entre el 1 y el 2,5% de la demanda energética global [7]. Por otro lado, el P procede de las rocas fosfatadas que son consideradas como recursos no renovables y sus reservas se encuentran en una situación crítica [8]. Por lo tanto, el desarrollo e implementación de sistemas de tratamiento que favorezcan el reciclaje de estos nutrientes podría contribuir a disminuir significativamente su demanda con el consiguiente beneficio económico y ambiental.

Del mismo modo, se debe tener en cuenta que los sistemas de tratamiento convencional de aguas residuales, a causa de la actividad microbiana de los fangos activos y del tratamiento de lodos, emiten gases de efecto invernadero (GEI) como el CO_2 , CH_4 y N_2O . En Europa se estima que las emisiones derivadas del tratamiento de depuración de agua pueden llegar a los 94 kg de CO_2 per cápita al año, lo que supone el 0,4% de las emisiones totales [9, 10]. Por lo tanto, el tratamiento de las aguas residuales mediante tecnologías convencionales contribuye a incrementar el calentamiento global y el cambio climático.

En conclusión, los sistemas de tratamiento de aguas residuales utilizados de manera generalizada en la actualidad, no contribuyen a conseguir los objetivos de clima y energía establecidos por el Consejo europeo para 2030 relativos a la reducción de emisiones de GEI (en relación con los niveles de 1990) y mejora de la eficiencia energética [11]. Por ello, durante las últimas décadas, ha resurgido con fuerza el interés de desarrollar tecnologías alternativas para el tratamiento de aguas. Entre estas alternativas, los bioprocesos basados en los consorcios microalgas-bacterias se vislumbran como una tecnología prometedora. Estos sistemas, descritos originalmente en la década de 1960 por el profesor Oswald [12], permiten reducir los costes energéticos asociados a la aireación en el tratamiento de agua, puesto que las microalgas producen el oxígeno necesario (usando luz solar como fuente de energía) para que las bacterias puedan metabolizar los contaminantes presentes en las aguas residuales. En el sentido opuesto,

las bacterias aportan el CO₂ que las microalgas necesitan para poder sintetizar biomasa fotosintética, y por otro lado eliminar nutrientes de las aguas. Este proceso permite reducir los costes de aireación y mitigar las emisiones de CO₂ mediante la fijación del carbono en forma de biomasa fotosintética. En términos generales, esta tecnología contribuye a mejorar la eficiencia energética y a mitigar las emisiones de GEI del tratamiento de aguas residuales [13].

A pesar de las prometedoras ventajas que presentan estos sistemas, su uso ha sido escasamente implementado. El insuficiente conocimiento del impacto que pueden generar los factores ambientales (entre ellos la intensidad lumínica que recibe el cultivo) sobre el proceso de depuración, genera desconfianza sobre las posibilidades de llevar al mercado esta tecnología. Del mismo modo, todavía no se ha prestado la atención necesaria al desarrollo poblacional ni a la caracterización términos de intercambio de oxígeno que se desarrollan en los consorcios microalgas-bacterias durante el proceso de depuración por lo que, normalmente, estos sistemas se operan como una caja negra, sin que sea posible conocer las interrelaciones que se producen entre los distintos microorganismos.

1.2. Objetivos de la tesis

La escasa información disponible sobre la composición de los consorcios microalgas-bacterias, sus interrelaciones metabólicas y el efecto de variables ambientales sobre el proceso de depuración constituye una barrera para la implementación de esta tecnología. Por ello, la presente tesis doctoral tiene como objetivo general caracterizar los consorcios microbianos microalgas-bacterias involucrados en la depuración de aguas residuales domésticas.

Este objetivo general se abordó mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de la capacidad de los consorcios microalgas-bacterias para eliminar contaminantes (materia orgánica, nitrógeno y fósforo) de aguas residuales domésticas en fotobiorreactores operados en diferentes condiciones.
2. Identificación de los diversos grupos microbianos, tanto microalgas como bacterias, presentes en los consorcios y el impacto de las condiciones del cultivo en su desarrollo.
3. Caracterización y modelización de las relaciones metabólicas a través de las fluctuaciones del oxígeno disuelto como herramienta para predecir la respuesta de los microorganismos del consorcio microalga-bacteria en diferentes condiciones ambientales de operación de los fotobiorreactores.

2. Introducción

2. Introducción

2.1. Aguas residuales

2.1.1. Descripción del problema hídrico

Según la Organización de las Naciones Unidas, se prevé que en el año 2030 se alcancen los 8.500 millones de habitantes en el planeta [2]. Como consecuencia de este incremento poblacional, se estima que en 2025, el 60% de la población mundial tendrá dificultad para acceder a un recurso indispensable para el desarrollo humano como es el agua. Además, el aumento de la población mundial, la mayor urbanización y la actividad industrial y agrícola de las últimas décadas han provocado que, en torno, a dos millones de toneladas diarias de residuos de origen humano sean vertidos a los cursos de agua sin el adecuado tratamiento [3]. Por estos motivos, en la actualidad existe gran preocupación por el aumento de la demanda de agua asociado al incremento de la población mundial.

En general, existe un escaso interés sobre el manejo adecuado de las aguas residuales, incluyendo su producción, gestión, reciclaje y vertido de las mismas. Para poder afrontar el problema de la gestión de las aguas residuales, como primera acción, es necesario controlar y regular su producción y generación. Según la Agencia Europea para el Medioambiente, 457,4 millones de europeos están conectados a sistemas de tratamiento de aguas residuales urbanas (Tabla 2.1) [4, 5]. A pesar de esto, en 2015, y a escala global, se estimaba que en los países con ingresos medio-alto y alto, los porcentajes de agua residual no tratada eran del 62% y del 30%, respectivamente [2, 6]. En los países en vías de desarrollo se calcula que los porcentajes de aguas residuales descargadas al medioambiente sin un tratamiento previo suponen entre el 72 y el 92% [2, 6].

Los elevados volúmenes de aguas residuales vertidos al medioambiente sin el adecuado tratamiento generan la contaminación de las aguas superficiales, las aguas subterráneas y los suelos. Según el Programa para el Medioambiente de las Naciones Unidas, los efectos nocivos de los vertidos de aguas residuales sin tratar, o con un tratamiento parcial, se clasifican en tres: efectos en la salud humana, consecuencias ambientales y posibles consecuencias sobre la actividad económica [7].

El vertido de aguas residuales al medioambiente genera un aporte extra de nutrientes (N y P) a los ecosistemas que puede desencadenar el fenómeno conocido como eutrofización. Este

exceso de nutrientes en los ecosistemas acuáticos fomenta el crecimiento de biomasa en forma de afloramientos de algas y propagación de plantas acuáticas. La muerte y descomposición de la biomasa de algas y plantas causa agotamiento del oxígeno. Esta falta de oxígeno afecta al desarrollo normal del ecosistema, reduciendo de manera drástica la biodiversidad, pudiendo resultar en la completa degradación del ecosistema afectado [8].

La Organización de las Naciones Unidas, dentro de los objetivos de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, contempla la necesidad de mejorar la calidad del agua y los sistemas de tratamientos de las aguas residuales [9]. Pero, para poder alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible a nivel mundial, marcados para el año 2030, será tarea indispensable reducir al 50% la cantidad de agua residual no tratada devuelta al medioambiente. Para ello es necesario aumentar las inversiones para llevar a cabo nuevas infraestructuras y el desarrollo de tecnologías que permitan incrementar el volumen de agua residual tratada y la reutilización de las mismas.

Tabla 2.1. Población europea por países conectada a los sistemas de tratamiento de aguas residuales, aguas residuales urbanas generadas y volumen que recibe tratamiento. Base de datos obtenidos de Eurostat del período 2010-2014.

	Población (millones de habitantes) ^a	Población conectada a sistemas de tratamiento(millones de habitantes)	Población conectada a sistemas de tratamiento (%) ^b	Volumen de aguas residuales generadas (millones m ³ año ⁻¹) ^c	Volumen de entrada en plantas de tratamiento (millones m ³ año ⁻¹) ^c
Bélgica	11,2	9,4	84,2	874,0	1.812,0
Bulgaria	7,2	4,4	60,6	426,1	528,5
República Checa	10,5	8,5	80,8	1119	788
Dinamarca	5,7	5,2	91,0	nd	nd
Alemania	81,2	77,4	95,4	nd	9.936,1
Estonia	1,3	1,1	83,0	289,1	nd
Irlanda	4,6	3,01	65,0	nd	nd
Grecia	10,9	10,1	92,8	nd	2
España	46,6	43,2	92,9	5.784,3	4.352,0
Francia	66,4	53,4	80,4	nd	nd
Croacia	4,2	1,6	36,9	512,4	256,7
Italia	60,8	34,7	57,0	nd	nd
Chipre	0,9	0,3	29,8	nd	nd
Letonia	2,0	1,4	71,0	190,6	109,0
Lituania	2,9	2,1	72,3	268,5	151,2
Luxemburgo	0,6	0,5	96,6	nd	nd
Hungría	9,9	7,6	76,7	nd	485,8
Malta	0,4	0,4	92,2	21,6	nd
Holanda	16,9	16,8	99,4	nd	1.695,2
Austria	8,6	8,2	95,0	2.396,2	1.131,1
Polonia	38,0	27,6	72,6	2.122,1	nd

Continuación Tabla 2.1.

	Población (millones de habitantes) ^a	Población conectada a sistemas de tratamiento(millones de habitantes)	Población conectada a sistemas de tratamiento (%) ^b	Volumen de aguas residuales generadas (millones m ³ año ⁻¹) ^c	Volumen de entrada en plantas de tratamiento (millones m ³ año ⁻¹) ^c
Portugal	10,4	5,8	55,1	527,4	nd
Rumanía	19,9	7,9	39,7	1.942,7	901,2
Eslovenia	2,1	1,2	58,6	115,5	nd
Eslovaquia	5,4	nd	nd	547,8	503,3
Finlandia	5,5	4,5	83,0	251,0	243,0
Suecia	9,8	93	95,0	nd	nd
Reino Unido	64,9	64,9	100,0	nd	nd
Noruega	5,2	3,7	71,8	nd	nd
Suiza	8,4	8,2	98,0	nd	1.401
Albania	2,9	0,2	6,0	53,9	nd
Serbia	7,1	0,8	10,6	448,9	5,9
Turquía	79,5	34,3	43,1	5.175,9	5,4
Bosnia Herzegovina	3,2	0,1	1,8	93,7	3.501,5
Kosovo	1,8	0,0	0,6	55,31	4,7
Total	610,9	457,4	74,9	23.216,0	27.814,0
Total EU (28)	508,4	410,2	80,7	17.388,3	22.896,0

^a) Datos obtenidos de Eurostat [4], ^b) Eurostat [5], ^c) Eurostat [10], nd: Datos no disponibles.

2.1.2. Aguas residuales

En función del origen las aguas residuales se pueden clasificar en: urbanas, industriales y agrícolas [2]. Cabe destacar que en muchas ocasiones los límites definidos en esta clasificación son laxos, ya que frecuentemente las aguas residuales urbanas están compuestas también por efluentes de las industrias presentes en las urbes y sus aguas son tratadas por los sistemas municipales. Se consideran aguas residuales urbanas los efluentes domésticos e industriales generados dentro de una población, incluyendo la escorrentía de las aguas pluviales. La generación de aguas residuales urbanas depende, en gran medida, del tipo de núcleo poblacional y las actividades industriales que allí se realicen. Los contaminantes de estas aguas son fundamentalmente:

- La materia orgánica (cuantificada en forma de demanda química de oxígeno, DQO) que contiene fracción biodegradable (cuantificada en términos de demanda biológica de oxígeno, DBO) y no biodegradable.
- El nitrógeno que puede encontrarse en forma de nitrógeno orgánico, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, NO_2^- y NO_3^- .
- El fósforo que aparece fundamentalmente en forma de PO_4^{3-} .

Las aguas residuales también pueden contener metales pesados (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn), sales y microorganismos patógenos [11]. Además, presentan sólidos en suspensión que normalmente se cuantifican como sólidos suspendidos totales (SST) y como sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Tabla 2.2) [12].

Tabla 2.2. Características físico-químicas de las aguas residuales urbanas obtenida de Guldhe *et al.* [11]; modificada de Metcalf y Eddie. [13]^a y Henze *et al.* [14]^b.

Parámetros	Concentración
SST (mg L ⁻¹) ^a	250-600
SSV (mg L ⁻¹) ^a	200-480
DBO ₅ (mg L ⁻¹) ^a	140-350
COT ^a	80-260
DQO ^a	250-800
Nitrógeno Kjeldahl Total (mg L ⁻¹) ^a	30-100
Nitrógeno Orgánico (mg L ⁻¹) ^a	8-25
Amonio (mg L ⁻¹) ^a	20-75
Nitritos y Nitratos (mg L ⁻¹) ^a	0,1-0,5
Fósforo Total (mg L ⁻¹) ^a	6-25
Fósforo Orgánico (mg L ⁻¹) ^b	2-10
Fosfato (mg L ⁻¹) ^a	4-15
Cloruros (mg L ⁻¹) ^b	30
Sulfatos (mg L ⁻¹) ^b	20
pH ^a	7-8
Alcalinidad (Eqvm ⁻³) ^a	1-7
Aluminio (g L ⁻¹) ^a	350-1.000
Cadmio, Cd (g L ⁻¹) ^a	1-4
Cromo, Cr (g L ⁻¹) ^a	10-25
Cobre, Cu (g L ⁻¹) ^a	30-70
Plomo, Pb (g L ⁻¹) ^a	25-80
Mercurio, Hg (g L ⁻¹) ^a	1-3
Coliformes Totales (UFC 100 mL ⁻¹) ^b	10 ⁶ -10 ¹⁰
Coliformes Fecales (UFC 10 mL ⁻¹) ^b	10 ³ -10 ⁸

^a) Fuente: Metcalf y Eddie. [13]

^b) Fuente: Henze *et al.* [14]

UFC: Unidades formadoras de colonias

En Europa (UE-28), teniendo en cuenta la cantidad de agua residual depurada en las plantas de tratamiento [10], el porcentaje de población conectada a sistemas de aguas residuales [5] y la población europea actual [4], se puede estimar que la cantidad de agua residual generada per cápita es de 153 L habitante⁻¹ d⁻¹. Considerando el valor de producción de agua per cápita media constante a lo largo de los años, y teniendo en cuenta el incremento de la población en Europa, se puede estimar el aumento de producción de aguas residuales durante los últimos 57 años [15]. En el año 1960 la producción de aguas residuales urbanas en Europa

era 22.714 millones $\text{m}^3 \text{año}^{-1}$, frente a los 28.376 millones $\text{m}^3 \text{año}^{-1}$ actuales, suponiendo un 25% de incremento.

En el caso español, el 92,9% de la población se encuentra conectada a los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Como se aprecia en la Tabla 2.1, las plantas de tratamiento (datos de 2014) reciben un caudal anual de 4.352 millones de $\text{m}^3 \text{año}^{-1}$ [10], de los que se trata el 94%, lo que supone 102 m^3 por habitante y año [1]. En el marco legal europeo la Directiva europea 91/271/CEE, modificada por la Directiva 98/15/CE del Consejo, marca los límites de concentración de los contaminantes en los efluentes para que puedan ser vertidos en las denominadas zonas sensibles a la contaminación (Tabla 2.3) [1, 16]. Dicha directiva fue transpuesta a la legislación española mediante el Real Decreto-Ley 11/1995 [17].

Tabla 2.3. Parámetros, concentraciones máximas permitidas o porcentaje de eliminación exigidos por la legislación europea y española referente al tratamiento de aguas residuales urbanas con vertido a zonas sensibles.

Parámetro	Concentración (mg L^{-1})	Porcentaje de eliminación (%)
DBO	25	70-90
DQO	125	75
SST	35 ^a -60 ^b	90 ^a -70 ^b
Fósforo total	2 ^c -1 ^d	80
Nitrógeno total	15 ^c -10 ^d	70-80

^{a)} Referente a poblaciones superiores a 10.000 equivalentes en habitantes (eh)

^{b)} Referente a poblaciones de entre 2.000 y 10.000 eh

^{c)} Referente a poblaciones de entre 10.000 y 100.000 eh

^{d)} Referente a poblaciones superiores a 100.000 eh

España cumple en un 84% con sus obligaciones sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas fijadas por la normativa europea referente a la calidad de vertido de los efluentes (Figura 2.1). Esto significa que el 16% de las descargas no son conformes ni con las directivas europeas ni con las españolas [1]. Los incumplimientos más graves se producen fundamentalmente en los siguientes casos:

- Poblaciones de más de 15.000 habitantes equivalentes que vierten sus aguas residuales en lo que se considera “zonas normales” sin el apropiado tratamiento. La Comisión europea sancionó a España con una multa de 46,5 millones de euros el 17 de noviembre

de 2016 por el incumplimiento de la sentencia (Asunto C-343/10) y reenvió el caso al Tribunal Europeo, proponiendo una multa diaria de 171.217 euros si el Estado español y sus Comunidades Autónomas no corregían esta situación antes de que el Tribunal volviese a dictar sentencia [18].

- Poblaciones de 10.000 habitantes equivalentes que vierten sus aguas en “zonas sensibles” sin el apropiado tratamiento. La Comisión Europea emitió un dictamen sancionador el 1 de diciembre de 2008 motivado por el incumplimiento de la normativa.
- Poblaciones de entre 2.000 y 15.000 habitantes equivalentes que vierten sus aguas residuales sin un adecuado tratamiento en “zonas sensibles”.

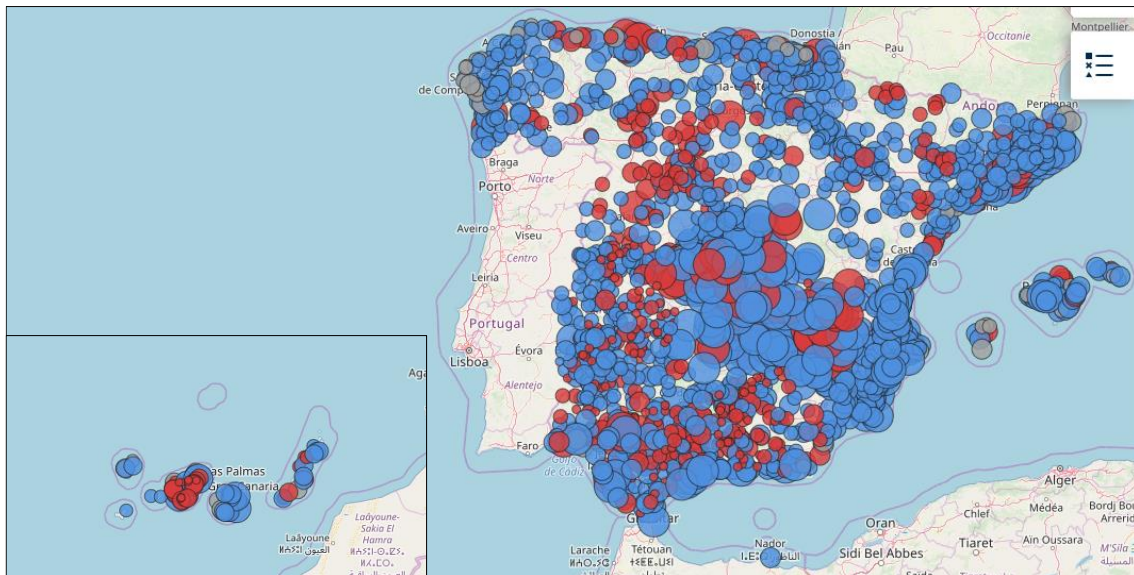


Figura 2.1. Cumplimiento de los índices legales de descarga de las EDAR españolas. Los círculos azules (●) representan las EDAR que cumplen con las normativas vigentes, los rojos (●) las que las incumplen, y las grises los no relevantes (●) [19].

Para evitar los incumplimientos de la normativa, que se traducen en sanciones económicas impuestas por las instituciones europeas, se requiere una serie de inversiones por parte del Estado español que permita cumplir los niveles de descarga exigidos por la legislación. El cumplimiento de los requerimientos fijados en la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea, necesita del mantenimiento y actualización de los sistemas de depuración actual y del desarrollo y puesta en marcha de nuevos sistemas y tecnologías para gestionar y depurar las aguas residuales de un modo más económico, ambiental y socialmente sostenible, especialmente en pequeños núcleos de población. En este contexto, la depuración de aguas

residuales utilizando consorcios microalgas-bacterias puede suponer una tecnología alternativa prometedora desde el punto de vista económico y ambiental frente a los sistemas de tratamiento aerobios y anaerobios más implantados.

2.2. Tratamiento convencional de depuración de aguas residuales urbanas

Para poder identificar las ventajas que presentan los sistemas fotosintéticos basados en las microalgas-bacterias sobre los sistemas convencionales (fangos activos), es necesario caracterizar y determinar el potencial y los límites de los procesos convencionales empleados para la eliminación de los contaminantes de las aguas residuales.

2.2.1. Descripción general de los procesos convencionales

Las aguas residuales deben ser tratadas de una manera eficiente antes de ser reutilizadas o devueltas al medio. Las aguas residuales pueden depurarse mediante tratamientos físicos, químicos, biológicos y combinaciones de ellos, estableciendo distintos niveles de tratamiento: preliminar, primario, secundario, terciario y avanzado [13]. A continuación, se describe el proceso de depuración tomando como ejemplo el tratamiento de aguas residuales urbanas ya que son las que se producen en mayor volumen y en las que las tecnologías empleadas para su depuración están más desarrolladas.

Pretratamiento y tratamiento primario

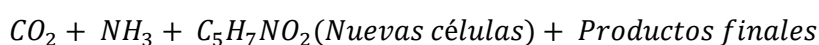
La función principal del pretratamiento y el tratamiento primario es la eliminación de sólidos suspendidos flotantes y sedimentables. Para dicha eliminación se emplean métodos físicos como la sedimentación, flotación, coagulación y floculación. En el pretratamiento, las aguas residuales sufren un cribado mediante un sistema de rejillas de diferente tamaño que elimina los sólidos en suspensión de mayor tamaño como papel, plásticos o biomasa vegetal. Posteriormente, el agua se somete a un desarenado y desengrasado que elimina las grasas, aceites y arena que pueden causar daños y obstrucciones en las siguientes fases del proceso. A continuación, las aguas pasan a una fase de sedimentación, conocida como tratamiento primario, en la que se elimina otra parte de los componentes flotantes y potencialmente

sedimentables. Este proceso se lleva a cabo en clarificadores o sedimentadores primarios. En los tratamientos primarios avanzados, se suelen emplear de manera complementaria reactivos químicos o filtros más finos para aumentar la eliminación de sólidos suspendidos y materia orgánica [13]. El tratamiento primario genera, por una parte, agua residual con menor contenido de materia orgánica, y por otra, lodos primarios que son recogidos en la parte inferior de los sedimentadores.

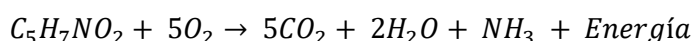
Tratamiento secundario

Eliminación de materia orgánica

La principal finalidad de este tratamiento es la eliminación de la materia orgánica en suspensión y soluble de las aguas (cuantificada en términos de DQO y DBO), y para ello se emplean métodos biológicos basados en la tecnología de los fangos activos. Este tratamiento consiste en la degradación de la materia orgánica por parte de bacterias aerobias. El cultivo bacteriano encargado de la depuración se encuentra en suspensión dentro del reactor biológico (denominado tanque de aireación) en una concentración de entre 2-4 g SSV L⁻¹ [13]. El desarrollo y crecimiento de los microorganismos es el fundamento de la eliminación de la materia orgánica y para ello requieren el suministro de oxígeno para alimentar su metabolismo heterótrofo según las reacciones 2.1 y 2.2:



Reacción 2.1. Oxidación de materia orgánica para la síntesis de biomasa bacteriana



Reacción 2.2. Consumo de oxígeno bacteriano para la obtención de energía metabólica

Este oxígeno se suministra a través de sistemas mecánicos de aireación como bombas soplantes o agitadores de superficie. La concentración de oxígeno necesaria para reducir los niveles de DQO de los efluentes a 100 mg L⁻¹ suele estar comprendida entre 2 y 4 mg O₂ L⁻¹ [13].

Los géneros mayoritarios que componen estos fangos activos son *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Lophomonas*, *Zoogloea*, *Sphaerotilus*, *Azotobacter*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus* y *Nocardia* [20].

Una vez eliminada la materia orgánica de las aguas, la biomasa microbiana generada es separada del agua en tanques de decantación secundaria. En estos tanques de sedimentación los microorganismos quedan retenidos en forma de fangos, parte de los cuales, para asegurar una concentración de microorganismos adecuada ($2-4 \text{ g SSV L}^{-1}$) para la eliminación de la materia orgánica, son reincorporados de nuevo a los tanques de aireación [13]. Esta recirculación hace que el fango permanezca más tiempo en contacto con el influente en el reactor. El tiempo que los microorganismos permanecen dentro del sistema se denomina tiempo de retención de sólidos (TRS). Para alcanzar la concentración de SSV adecuada, los TRS deben situarse entre 4 y 10 días [13, 20]. Cuanto mayor sea el TRS, mayor cantidad de microorganismos habrá en el reactor y, por lo tanto, mejores eliminaciones de materia orgánica. Sin embargo, un aumento excesivo del TRS, por encima de 10 días, puede generar la liberación de productos por parte de los microorganismos que afecten negativamente a las eliminaciones de DQO y a la capacidad de decantación del fango [20].

Los fangos activos que no son reincorporados al tanque de aireación son tratados para su degradación en lo que se conoce como “línea de fangos”. Esta línea de tratamiento consiste en tanques de digestión anaerobia donde los fangos activos (secundarios) y los fangos del tratamiento primario son revalorizados en forma de biogás. En los casos en los que los sistemas de tratamiento no cuenten con este sistema anaerobio, los fangos sufren un proceso de compostaje para la elaboración de enmiendas sólidas útiles para la agricultura o pueden ser incinerados para su eliminación [13].

En el caso de que la carga orgánica de las aguas residuales sea superior a 1.500 mg L^{-1} (como pueden ser algunas aguas industriales) puede acoplarse al tratamiento secundario un pretratamiento anaerobio. Este proceso se suele emplear para reducir los costes económicos que supondría suministrar el oxígeno necesario para eliminar estas altas cargas de materia orgánica. En este sentido debe considerarse que, cuanto mayor es la concentración de la materia orgánica, mayor es el coste energético del tratamiento ($1,10-6,09 \text{ kWh kg DBO}^{-1}$, $1 \text{ kWh kg DQO}^{-1}$) [21, 22]. Con el tratamiento anaerobio se consiguen rendimientos de eliminación de materia orgánica en torno al 70-80%. Por esta razón es conveniente combinar este tratamiento con el tratamiento secundario aerobio para conseguir eliminaciones de materia orgánica superiores (85-95% [22]). Como beneficio complementario, el proceso anaerobio permite convertir y

revalorizar la materia orgánica del agua en forma de biogás (compuesto en un 60-75% por metano) [22].

Eliminación de nutrientes: nitrógeno y fósforo

Muchas plantas de tratamiento que vierten en zonas no sensibles finalizan la depuración de las aguas después de la eliminación de materia orgánica hasta los límites fijados por la legislación y vierten los efluentes a los cursos de agua. Estos efluentes todavía pueden contener concentraciones de N (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) de entre 20-40 mg L^{-1} y P-PO_4^{3-} de 1-10 mg L^{-1} [23, 24]. Para evitar problemas de degradación de los cauces hídricos, la legislación europea (Directiva 91/271/CEE y Directiva 98/15/CE del Consejo Europeo) exige la eliminación de N y P de las aguas residuales, fijando las concentraciones de descarga y los porcentaje de eliminación reflejados en la Tabla 2.3 (Pág. 13) [1].

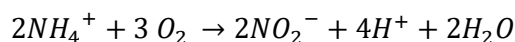
Eliminación de nitrógeno

Debido a la composición química del fango activo, los microorganismos presentes en el fango activo contienen entre el 22 y 28% de C, entre el 3 y 5% de N y entre el 2 y 3% de P en peso seco [25, 26]. Por lo tanto, el primer mecanismo de eliminación del N es su asimilación en forma de biomasa durante el tratamiento secundario. Esta asimilación no suele ser suficiente para obtener efluentes conformes a la legislación. Es por ello que, para eliminar el total de N, es necesario implementar durante el tratamiento secundario sistemas biológicos de nitrificación-desnitrificación, complementarios a la asimilación o añadir reactivos químicos.

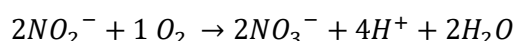
La eliminación de N es una operación, compleja y costosa energética y económicamente, ya que requiere acoplar tanques aerobios con tanques anóxicos, sistemas de bombeo, de agitación, aireación y recirculación de los efluentes y de fangos.

Para conseguir efluentes con concentraciones de N que cumplan con los requerimientos fijados por la legislación vigente para zonas sensibles (10-15 mg NT L^{-1} , Tabla 2.3, Pág. 13) es necesaria una etapa de nitrificación en la que el NH_4^+ es oxidado a NO_3^- . La nitrificación ocurre en dos fases en las que participan géneros bacterianos como *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* o *Nitrococcus*. La primera fase, realizada por bacterias de género *Nitrosomonas*, consiste en la conversión de NH_4^+ a NO_2^- (Reacción 2.3). La segunda fase, llevada a cabo por bacterias de los

géneros *Nitrobacter* y *Nitrococcus*, consiste en la conversión del NO_2^- en NO_3^- (Reacción 2.4) [13, 20].



Reacción 2.3. Reacción de la primera fase de la nitrificación



Reacción 2.4. Reacción de la segunda fase de la nitrificación



Reacción 2.5. Reacción general de la nitrificación

Como se aprecia en la reacción general de nitrificación (Reacción 2.5), para oxidar un mol de NH_4^+ son necesarios 2 moles de oxígeno. Esto implica que, por cada gramo de N-NH_4^+ se deben aportar 4,6 gramos de oxígeno. La nitrificación se inhibe a valores de oxígeno disuelto inferiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ [13]. La aportación de oxígeno se realiza en los tanques de aireación, donde también ocurre la eliminación de materia orgánica, mediante turbinas o difusores con un alto gasto energético. Durante el proceso de nitrificación se produce una disminución del pH debido a la liberación del ion protón. El pH óptimo del proceso está entre 7 y 8 y se inhibe a pH superiores a 9,6 e inferiores a 6 [27].

Las bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son autótrofas y, por tanto, requieren carbono inorgánico para realizar la reacción de nitrificación. Durante la fase de nitrificación se consume aproximadamente $7,14 \text{ kg}$ de carbono cálcico (CaCO_3) por cada kg de N-NH_4^+ eliminado. Normalmente la alcalinidad del agua residual es suficiente para que pueda realizarse el proceso de nitrificación ($50\text{-}100 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$). Sin embargo, si no es suficiente puede frenar el metabolismo de las bacterias responsables del proceso, por lo que puede ser necesaria la adición de CaCO_3 o incorporar agua residual fresca [13].

La desnitrificación, en cambio, ocurre en condiciones de anoxia donde el NO_3^- se convierte a N_2 . Este proceso lo realizan bacterias heterótrofas de los géneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*,

Flavobacterium, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* y *Vibrio* [13].

Hay dos vías bioquímicas de desnitrificación; la asimilativa y la desasimilativa. La vía asimilativa ocurre cuando el N-NH_4^+ no está disponible en el medio y, por tanto, el NO_3^- se emplea como fuente de N para la síntesis de biomasa. En cambio, en la desnitrificación desasimilativa, tanto el NO_2^- como el NO_3^- se incorporan en la cadena de transporte de electrones como aceptores, reduciéndose a N_2 , lo que imposibilita la recuperación de este elemento en forma de biomasa y su futura revalorización. Este mecanismo de eliminación supone el 90% de la eliminación del N en las EDAR convencionales [13].

Eliminación de fósforo

En base a la fórmula empírica de la biomasa ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{NP}_{0,1}$) [13, 20] los microorganismos presentes en el fango activo suelen contener entre un 22 y 28% de C, entre un 3 y 5% de N y entre el 2 y 3% de P en peso seco [25]. El primer mecanismo de eliminación de fósforo es su asimilación por los microorganismos fijándose en la biomasa bacteriana. A pesar de esto, como ocurría con el nitrógeno, la asimilación no suele ser suficiente para reducir los valores de fósforo en las aguas hasta niveles conformes a la legislación.

Uno de los mecanismos más empleados para la eliminación del P es la precipitación química, recurriendo a la adición de cationes como Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} . La adición de estos compuestos químicos es una técnica sencilla que permite eliminar el P. Sin embargo, esta tecnología cuenta con una serie de desventajas como son el aumento de la generación de fangos a gestionar y los costes asociados a los productos químicos [13, 20].

Para evitar los inconvenientes de la precipitación química se pueden emplear técnicas de eliminación biológica. El fundamento de esta técnica se basa en el metabolismo de los microorganismos conocidos como organismos acumuladores de polifosfatos (OAF). Uno de los géneros de OAF que tienen una mayor capacidad de acumular P es *Acinetobacter* (25% del peso seco) [28]. La acumulación de los OAF, solo la realizan en situaciones alternantes de aerobiosis y anaerobiosis. Son microorganismos heterótrofos que, en condiciones de anaerobiosis, asimilan ácidos grasos volátiles (AGV) como el acetato. Para acumular estas reservas consumen el glucógeno intracelular y sus propias reservas de polifosfatos. Cuando los OAF se encuentran en situaciones de aerobiosis (tanques de aireación secundarios), consumen sus propias reservas

internas de AGV para sintetizar glucógeno y asimilar el P soluble del medio y acumularlo en forma de polifosfatos [20]. Para que se fomente el desarrollo de los OAF se debe operar el reactor anaerobio con un TRS entre 0,5 a 2 horas [13, 28]. Cuando los OAF son arrastrados por el influente al tanque aerobio, consumen las reservas de AGVs y acumulan fosfato eliminándolo del medio. La eliminación de P es dependiente de la relación DBO:P. Las relaciones DBO:P superiores a 20 permiten obtener concentraciones de P en el efluente inferiores a 1 mg P L^{-1} [13, 28].

Tanto la eliminación biológica de N como de P son procesos dependientes de la generación de ambientes aerobios en el medio acuoso. Sin embargo, el suministro de aire contribuye notablemente al gasto energético de las EDAR y la emisión de gases y aerosoles. Además, las transiciones de medio anóxico y aerobio necesitan bombeos adicionales e instalaciones complejas.

2.2.2. Valoraciones energéticas y ambientales del tratamiento convencional

El gasto energético que implica el tratamiento de las aguas residuales supone un considerable porcentaje de la demanda eléctrica de los países. Por ejemplo, Suecia, Alemania e Italia emplean el 1% de su electricidad en depurar sus aguas residuales [21, 29]. En EEUU y en el Reino Unido, este valor asciende al 3% y países como Israel, que sufren escasez de agua, puede llegar hasta el 10% [21]. En España, el consumo energético es de aproximadamente $0,66 \text{ kWh m}^{-3}$ [30]. Teniendo en cuenta los 4.352 millones de m^3 de aguas residuales tratadas en España (Tabla 2.1, Pág. 9), se puede estimar que el tratamiento de aguas genera un consumo total de $2,74 \text{ TWh año}^{-1}$. El volumen de la demanda energética según Red Eléctrica Española para el año 2017 fue de 268,5 TWh, por lo que el tratamiento de aguas supuso el 1,02% de la demanda energética, porcentaje similar a los países del entorno europeo [31]. Estos altos consumos energéticos hacen que las plantas de tratamiento de agua residual sean las infraestructuras municipales que consumen más energía [32]. El mayor consumo se emplea en la aireación de los tanques e, independientemente de la tecnología utilizada, son necesarios entre 0,20 y 0,34 kWh por m^3 de agua tratada [32, 33], pudiendo representar porcentajes de consumo eléctrico de entre el 45-75% del total de energía consumida en la planta de tratamiento [34].

Los costes energéticos y económicos de los sistemas convencionales de tratamiento de aguas aumentan de manera inversamente proporcional al volumen de agua a tratar. En las

poblaciones de entre 2.000 y 15.000 habitantes, la implementación de sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales requiere elevadas inversiones económicas para el desarrollo de las infraestructuras y los costes de operación [7, 13]. Las plantas de tratamiento que sirven a poblaciones de 50-200 habitantes equivalentes (he) tienen costes anuales en inversión de 400-200 € he⁻¹ y gastos operacionales de 20-70 € he⁻¹ año⁻¹ respectivamente [35]. Esto conlleva que muchas administraciones locales no puedan hacer frente a los gastos que supone el tratamiento de sus aguas. En el Estado español, el 72% de los municipios cuentan con menos de 2.000 habitantes, lo que se corresponde al 7% de la población total. El elevado número de pequeños núcleos rurales, dispersos por un amplio territorio, eleva significativamente las inversiones necesarias para el tratamiento las aguas residuales [36]. Se estima que en España un 16% de los núcleos poblaciones tienen un sistema de tratamientos de aguas residuales deficiente [1].

Otra de las desventajas de estos sistemas convencionales de depuración de aguas residuales es la emisión de GEI. Las emisiones generadas por la actividad de las plantas de tratamiento se dividen en emisiones directas (producidas o relacionadas con los procesos biológicos) y emisiones indirectas asociadas a los consumos energéticos de la propia planta [37]. Varios autores señalan la falta de información sobre la generación y emisión de GEI durante el tratamiento de aguas residuales [37, 38]. Se considera que las emisiones de CO₂ procedentes de la eliminación biológica de la materia orgánica y el decaimiento celular de las bacterias no contribuyen al efecto invernadero ya que el carbono proviene de los ciclos biogeoquímicos [39]. Aunque este dióxido de carbono no sea de origen fósil y no sea una emisión objetivo, su reducción puede contemplarse como un efecto positivo desde el punto de vista medioambiental.

La implementación a escala industrial de las tecnologías basadas en los consorcios microalgas-bacterias podría contribuir a disminuir la emisiones de CO₂ procedente de la eliminación de materia orgánica, favoreciendo el reciclaje de carbono en forma de biomasa fotosintética (Figura 2.2) [40].

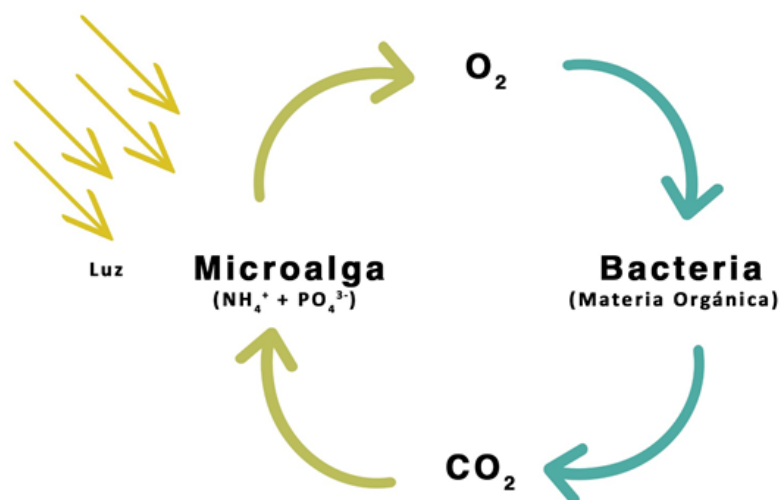


Figura 2.2. Esquema de las relaciones entre las microalgas y bacterias durante el proceso de tratamiento de agua residual [40].

A pesar de que las mayores emisiones de GEI en España provienen del sector de la producción de energía (77% de las emisiones totales según el Ministerio para la Transición Ecológica), las EDAR suponen el 0,4% de las emisiones de GEI totales en los últimos 8 años (Tabla 2.4) [41-43]. Las emisiones en CO₂e (equivalente de CO₂) de las EDAR españolas oscilan entre las 1.199,0-1.207,5 Kt, que suponen entre un 8-9,1% del total de emisiones generadas en procesos de tratamiento de los residuos [44].

Tabla 2.4. Emisiones de GEI procedentes del tratamiento de agua residual, porcentaje que representan las dichas emisiones frente a las emisiones totales y frente a las emisiones procedentes de la gestión de los residuos.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
CO₂e (kt)	1.199,0	1.207,5	1.207,3	1.202,3	1.999,5	1.199,3	1.202,1
CO₂e/ emisiones totales GEI	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%
CO₂e/ emisiones GEI residuos	8,2%	8,0%	8,1%	8,3%	8,8%	8,3%	8,4%

En el trabajo realizado por Koutsou *et al.* [38], sobre la emisión de GEI en el tratamiento de aguas urbanas, se estimó que en Grecia se emiten 763.580 t CO₂e por año, lo que supone 94,3 kg CO₂e habitante⁻¹ año⁻¹. Con los datos obtenidos por estos autores se puede estimar que

entre el 44,7 y el 47,7% de las emisiones anuales de CO₂e procede de la oxidación de la materia orgánica, el decaimiento celular y la generación de la energía necesaria para la aireación de los tanques secundarios [38].

Las limitaciones económicas y medioambientales de los tratamientos de aguas residuales basados en los fangos activos, hacen necesario el desarrollo de nuevas tecnologías de bajo coste que permitan superar estas barreras, especialmente en los pequeños núcleos de población. La emisión de GEI podría reducirse gracias a las ventajas de los sistemas basados en tecnologías fotosintéticas (Figura 2.2). Las características que deben presentar los nuevos sistemas de tratamiento son:

1. Permitir un tratamiento de aguas económicamente viable de las poblaciones con menos de 15.000 he.
2. Reducir o eliminar la demanda energética asociada a la aireación de los reactores aerobios.
3. Facilitar la mitigación de GEI, reduciendo las emisiones y revalorizando los subproductos para cumplir con los principios de economía circular y desarrollo sostenible.
4. Mejorar el reciclaje de nutrientes en forma de biomasa para poder ser revalorizados como biofertilizantes para disminuir la demanda de los fertilizantes químicos.

2.3. Tecnologías alternativas: Tratamiento fotosintético

Para poder dar solución a los principales inconvenientes económicos y ambientales de los tratamientos convencionales se pueden implementar sistemas alternativos basados en el metabolismo autótrofo de los microorganismos fotosintéticos y su simbiosis con heterótrofos aerobios. En 1957, Oswald propuso el uso de microalgas como una alternativa eficiente para el tratamiento de aguas residuales y estableció las bases del funcionamiento de los cultivos mixtos.

Gracias a la generación *in situ* de oxígeno por parte de las microalgas, es posible reducir los costes de aireación del tratamiento de depuración de agua que, como se describió en el apartado anterior, puede suponer hasta el 75% de los costes energéticos totales de las EDAR [34, 45, 46]. Tomando 0,66 KWh m⁻³ como valor referente del coste medio de electricidad del tratamiento de agua en España [30] y los valores de 0,05-0,08 KWh m⁻³ correspondientes a los costes medios del tratamiento basado en los consorcios microalgas-bacterias a escala piloto y

demonstración [47], el ahorro energético que puede obtenerse utilizando este tipo de tratamiento estaría entre el 87 y el 92%.

Los elementos básicos que necesitan las microalgas para desarrollarse son: una fuente lumínica, C, N, P y metales traza. La luz puede obtenerse de la radiación solar, el C del CO₂ atmosférico, pero el P y el N deben ser suministrados en el medio de cultivo [3, 48]. Como se describió en el apartado 2.1.2 (Tabla 2.2, Pág. 12), las aguas residuales son ricas en nutrientes lo que las convierte en medios de cultivo potencialmente útiles para estos microorganismos fotosintéticos. Atendiendo a la composición molecular de la biomasa (CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01} [49]) y a las estimaciones de producción media descritas por Carlsson *et al.* [50] (41,1 g m⁻² d⁻¹) y Chisti *et al.* [51] (72,1 g m⁻² d⁻¹), es necesario aportar entre 2,7 y 4,7 g m⁻² d⁻¹ de N y entre 0,5 y 1,0 g m⁻² d⁻¹ de P para un óptimo crecimiento de las microalgas.

El empleo de las aguas residuales como medio de cultivo para el desarrollo de las microalgas, es un proceso de biorremediación ya que conlleva la eliminación de los nutrientes de las propias aguas. Esto se debe a que los microorganismos absorben y degradan los elementos contaminantes, limpiando así el agua. La biomasa microbiana generada en el proceso de depuración puede ser posteriormente revalorizada en forma de biocombustibles, bioproductos o biofertilizantes [52, 53].

2.3.1. Biorreactores empleados en la depuración fotosintética de aguas residuales

Para la utilización de microalgas con fines comerciales es necesario cultivar estos microorganismos en condiciones fotótrofas, y para ello es necesario el empleo de fotobiorreactores (FBRs) que deben ser diseñados, contruidos y operados de manera específica para satisfacer los requerimientos del proceso biotecnológico. Los FBRs permiten el cultivo masivo de microalgas manteniendo un medio estable de temperatura, luz, pH, concentración de oxígeno y nutrientes. Para garantizar una distribución homogénea de estos elementos, los FBRs deben disponer de sistemas de agitación que permitan mantener los microorganismos en suspensión, promover el acceso a los nutrientes y la luz, y evitar así la formación de gradientes que puedan dificultar el desarrollo del bioproceso [54].

Los FBRs se clasifican, según el contacto del cultivo con el medio exterior, en abiertos o cerrados. Los sistemas cerrados son aquellos en los que el medio de cultivo no se encuentra en contacto directo con el ambiente (Figura 2.3). Estos reactores facilitan el cultivo de una única

especie de microalga ya que permiten un mejor aislamiento del medio externo y de las precipitaciones y, por lo tanto, evitan contaminaciones y posibilitan un mayor control de las condiciones de cultivo. Los sistemas cerrados más empleados son las columnas de burbujeo, los reactores tubulares y los *flat panels* [54]. Este tipo de sistemas, a pesar de su mayor coste de construcción, mantenimiento y operación, son los más adecuados para obtener producciones estables de compuestos de alto valor como pigmentos, suplementos alimenticios como los ácidos grasos poliinsaturados y productos farmacéuticos. Además, la mayor eficiencia de la fotosíntesis y la capacidad de fijación del CO₂ que presentan los sistemas cerrados, con respecto a los abiertos, permiten obtener productividades de hasta 0,4 g L⁻¹ d⁻¹ [55].

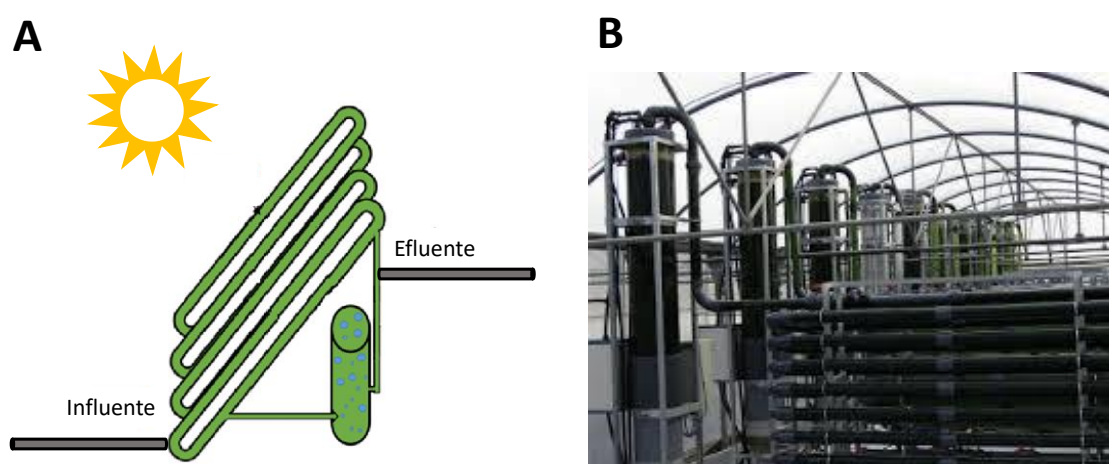


Figura 2.3. A) Esquema de un FBR cerrado tubular. B) Ejemplo de un FBR tubular de las instalaciones de Las Palmerillas, Almería.

El otro grupo de FBRs más empleados se denominan sistemas abiertos (lagunas, reactores en capa fina o *thin layer* y los canales cerrados tipo *raceway*) (Figura 2.4). En estos sistemas el cultivo se encuentra en contacto directo con el medio exterior, lo que dificulta el cultivo monoespecífico de microalgas y tienen mayor dependencia de las condiciones atmosféricas. Estos sistemas de producción, sin embargo, son más sencillos de operar y permiten que subproductos como el oxígeno se eliminen por difusión directa evitando el daño celular por sobresaturación de oxígeno (ver Apartado 2.3.4, Pág. 48). De la misma manera, la mayor evaporación que se produce en los sistemas abiertos comparado con los cerrados genera un control natural de la temperatura y evita tener que invertir energía para la termostatación del reactor. Por estos motivos, los FBRs abiertos permiten alcanzar productividades de biomasa

máximas de $0,1 \text{ g SSV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de manera más económica que los cerrados [47, 56]. Debido a los menores costes de operación e instalación, los sistemas abiertos son los más empleados para el tratamiento de aguas residuales [47, 57-59]. Hay que señalar que, aunque las productividades por unidad de volumen sean inferiores en los sistemas abiertos, las productividades por unidad de superficie son comparables entre ambos tipos de sistemas [47, 60].

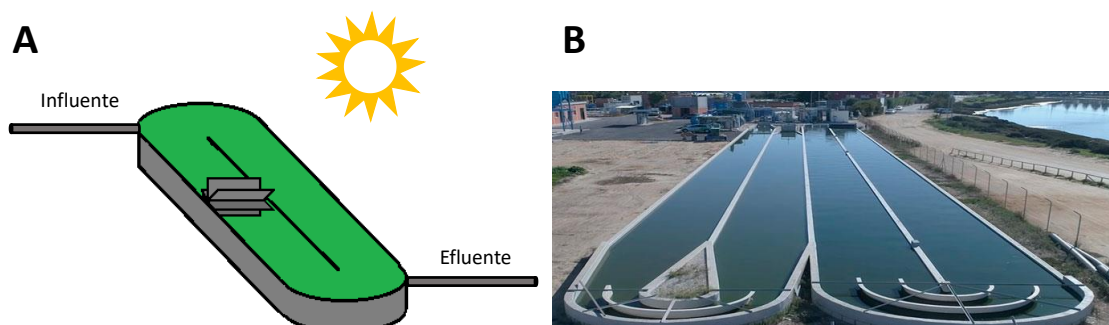


Figura 2.4. A) Esquema de un FBR abierto tipo *raceway*. B) Ejemplo de un reactor abierto tipo *raceway*, Chiclana de La Frontera, Cádiz.

A pesar de los múltiples diseños disponibles, las tecnologías con mayor implementación en el tratamiento de agua a nivel mundial son los conocidos como HRAP (por sus siglas en inglés *High Rate Algal Pond*) o también llamados *raceway* [47, 61]. Los FBRs tubulares también se han utilizado en el estudio del tratamiento de aguas, pero su uso a gran escala está limitado por el elevado coste de operación. El principal coste energético en la operación de los FBRs tubulares está en el sistema de agitación, ya que requieren una potencia instalada de entre 1.000 y 2.000 W m^{-3} de reactor [55] mientras que los tipo *raceway* suelen operar en un rango de $0,1$ y 2 W m^{-3} [60].

En comparación con los sistemas convencionales de tratamiento de aguas basados en los fangos activos, los sistemas tipo *raceway* tienen menos requerimientos para su construcción, mantenimiento y operación [62]. El tratamiento de aguas empleando FBRs tipo *raceway* consume entre $0,05$ - $0,08 \text{ kWh m}^{-3}$, mientras que los sistemas basados en los fangos activos, tienen un consumo energético de $0,66 \text{ kWh m}^{-3}$ de agua tratada [30].

Los sistemas tipo *raceway* fueron desarrollados originariamente por el profesor Oswald en 1967 [63] y su diseño ha sido mejorado durante las últimas décadas [47, 64]. De manera resumida los *raceway* consisten en balsas divididas en canales donde el efluente es recirculado

mediante un sistema de agitación tipo rueda de palas (*paddle wheel*) a unas velocidades comprendidas entre los 0,15-0,30 m s⁻¹, lo que además, facilita la desgasificación del sistema [54]. La profundidad en la que se suelen operar los *raceways* puede variar entre los 0,2-0,4 m. El tamaño de estos sistemas abiertos puede ser desde pocos metros cuadrados hasta hectáreas [47, 54, 58]. Los modelos originales se han ido mejorando mediante la introducción de sistemas de control de la profundidad o la presencia de deflectores de flujo en las curvas para mejorar la agitación y evitar la sedimentación de la biomasa [60, 65, 66]. En los últimos años también se ha explorado el uso de sistemas alternativos a las ruedas de palas, como agitadores de hélice [67]. Adicionalmente, las balsas pueden también estar equipadas con bombas de inyección de gases (aire o CO₂) [60, 68]. Estos sistemas contribuyen a controlar el pH, aumentar la disponibilidad de carbono y el reducir la proporción CO₂/O₂, cuyo efecto será descrito en profundidad en el Apartado 2.3.4 (Pág. 33).

Para incrementar la productividad fotosintética, y con ella los rendimientos de eliminación de nutrientes, sin repercutir considerablemente en los gastos económicos, se han empleado como fuentes de CO₂ los gases de combustión de calderas (4-12%) alimentadas con combustibles fósiles o el CO₂ presente en el biogás. La utilización de efluentes gaseosos ricos en CO₂ para aumentar la productividad de los cultivos de microalgas y fijarlo en forma de biomasa, es una alternativa interesante para ayudar a reducir las emisiones de GEI. La poca profundidad de los *raceways* (0,2-0,4 m) hace que las burbujas de CO₂ tengan poco espacio para difundirse en el efluente y por ello los difusores de gases se sitúan en sumideros, donde la profundidad aumenta (1 m) y, por tanto, el espacio de difusión de las burbujas de CO₂ es mayor [69].

Existen numerosas referencias en la bibliografía que demuestran la eficacia de los sistemas tipo *raceway* para el tratamiento de aguas. Por ejemplo, en el trabajo publicado por Arcila *et al.* se obtuvieron eliminaciones de materia orgánica superiores al 90% y de nitrógeno del 85% [70]. En los *raceway* pilotos empleados por Kim *et al.* se eliminó el 85% de la materia orgánica, el 93% del nitrógeno y el 83% de los fosfatos [71]. Park y Craggs, utilizando *raceway* de 8 m³ con sistemas de inyección de CO₂, consiguieron eliminar el 85% de la materia orgánica, el 92% del nitrógeno y eliminaciones de fosfatos superiores al 70% [61]. Posadas *et al.* obtuvieron eliminaciones de materia orgánica, nitrógeno y fósforo de 84, 79, y 57%, respectivamente, en un *raceway* de 700-850 L con sistemas de control de pH mediante adición de CO₂.

Debido a los buenos resultados obtenidos en la depuración de agua con la utilización de microalgas en sistemas tipo *raceway*, actualmente existen ejemplos del empleo de estas

tecnologías para el tratamiento de aguas residuales urbanas a escala industrial. Pueden citarse las instalaciones de Cambridge y Christchurch (Nueva Zelanda) con unas superficies de 5 y 2 hectáreas, respectivamente y las de Chiclana de La Frontera (España) de 10 ha [47, 69].

2.3.2. Microorganismos fotosintéticos

Microalgas

Desde un punto de vista taxonómico el término alga hace referencia a organismos fotosintéticos pertenecientes al dominio Eukarya. A pesar de ser muy frecuentes en ambientes acuáticos iluminados, ya sea en masas de agua dulce o salada, también se encuentran en ambientes terrestres húmedos.

Las algas se clasifican según su tamaño, complejidad y estructura en macroalgas y microalgas. Las macroalgas son organismos pluricelulares que poseen tejidos especializados con funciones estructurales, de soporte y fotosintéticas que recuerdan a las hojas, tallos y raíces de las plantas superiores. En cambio, las microalgas son un grupo de microorganismos eucariotas unicelulares fotosintéticos, de entre 5 a 50 μm , que pueden aparecer aisladas o formando estructuras multicelulares simples [72]. Estos microorganismos pertenecen al Reino Protista, son de vida libre y tienen un metabolismo fotoautótrofo, aunque algunas pueden crecer en regímenes de mixotrofia o heterotrofia [73]. Estos microorganismos tienen cloroplastos y otras características celulares homólogas a las células de las macroalgas y plantas terrestres, como son la doble membrana tilacoidal, la presencia de clorofila A y B, pigmentos como el β -caroteno o xantofilas y la posibilidad de acumular almidón como material de reserva [72].

Las microalgas, al ser eucariotas, poseen orgánulos membranosos y su pared celular, en la mayor parte de grupos, es rígida y está formada por polisacáridos estratificados, lo que le confiere gran resistencia mecánica. Las microalgas son el grupo más diverso de eucariotas incluyendo formas móviles flageladas, cocoides, filamentosas ramificadas o no, pasando por macrófitos y taxones multinucleados (Figura 2.5).

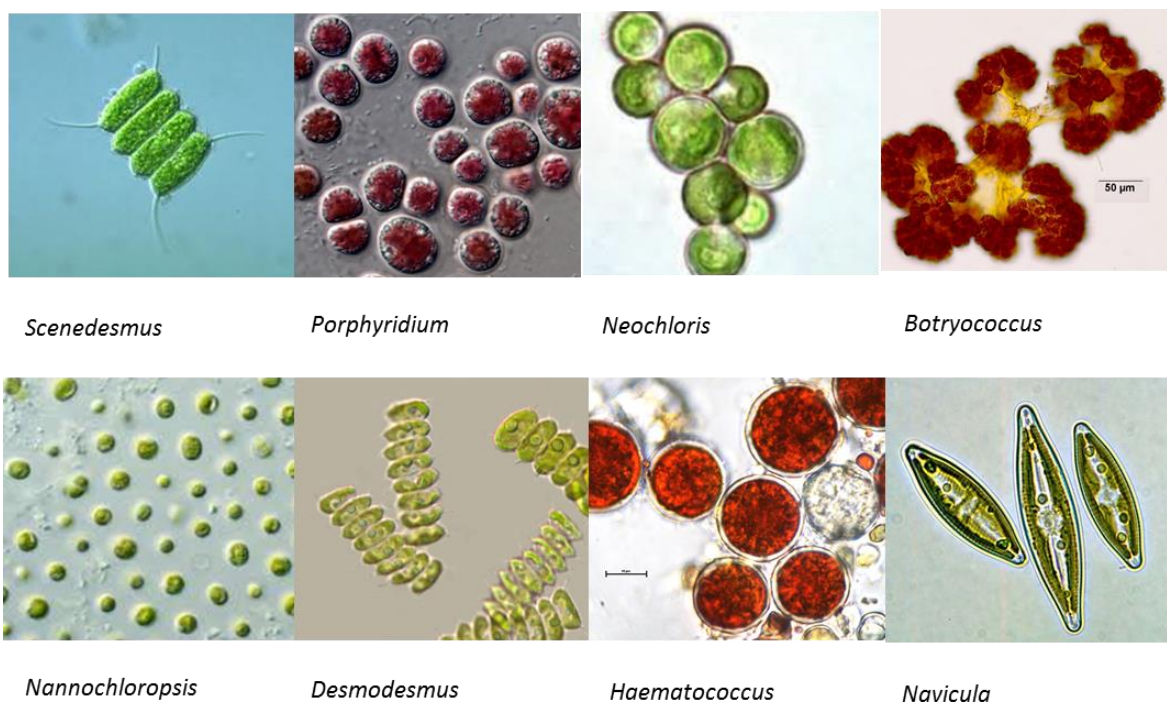


Figura 2.5. Ejemplos de la diversidad de microalgas.

Debido a los diferentes criterios en los que se ha basado su clasificación (morfología, ultraestructura y criterios moleculares), este grupo de microorganismos es difícil de clasificar y, en la actualidad, se establecen nueve divisiones. Las algas verdes pertenecen al grupo *Chlorophyta*, y las algas rojas a *Rhodophyta*. También son consideradas microalgas la clase *Bacillariophyta* (entre las que se encuentran las diatomeas), las *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta* y *Chrysophyta* [72, 74]. Las microalgas, por orden de abundancia, son las algas verdes, las diatomeas y las algas doradas (*Chrysophyta*) [75]. Dentro de los géneros más frecuentes desarrollados de manera natural en los FBRs destinados al tratamiento de aguas se encuentran: *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Micractinium*, *Pediastrum*, *Desmodesmus*, *Chlamydomonas*, *Protoderma*, *Microspora*, *Nitzschia*, *Achananthes*, *Oocystis*, *Senellastrum*, *Microcystis*, y *Actinastrum*, entre otras [62, 71, 76-78]

Por otro lado, hay otros grupos de microorganismos fotosintéticos, las cianobacterias, que presentan características comunes a las microalgas, pero tienen un origen evolutivo distinto. Estos microorganismos fotosintéticos unicelulares son procariotas y son los precursores de los plastos de los organismos fotosintéticos eucariotas (algas y plantas terrestres) por el proceso conocido como endosimbiosis. A este grupo de bacterias Gram negativas se las ha conocido tradicionalmente como “algas verde-azuladas” por su carácter fotosintético y por su

pigmentación. Las cianobacterias, se caracterizan por presentar como pigmentos fotosintéticos la clorofila A y la ficobilina. Al igual que las microalgas, las cianobacterias tienen diversas morfologías y pueden encontrarse en múltiples hábitats [79, 80].

Bacterias fotótrofas púrpuras, *α -Proteobacteria*

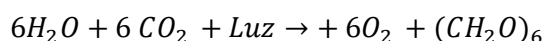
Otros microorganismos con características interesantes para el tratamiento de agua residual urbana son las procariotas clasificados como bacterias fotótrofas púrpuras o pertenecientes a la clase *α -Proteobacteria*. Las *α -Proteobacteria* son un grupo diverso de bacterias fotótrofas frecuentemente presentes en ambientes acuáticos con abundante radiación solar [81]. La presencia de la bacterioclorofila A le confiere a este grupo bacteriano la capacidad de asimilar la energía solar a través de la fotosíntesis anoxigénica [82]. La fotosíntesis anoxigénica es una ruta anabólica en la que no se libera oxígeno como subproducto ya que los donadores de electrones son compuestos orgánicos y no la molécula del agua. Estos microorganismos presentan rasgos interesantes para el tratamiento de aguas como su metabolismo heterótrofo/autótrofo [83, 84]. En presencia de luz pueden realizar la fotosíntesis anoxigénica y en condiciones de oscuridad pueden emplear rutas metabólicas oxidativas para la obtención de energía [85].

2.3.3. Características biotecnológicas de las microalgas

Las microalgas presentan relaciones superficie/volumen mayores que las macroalgas y las plantas terrestres, lo que les permite tener mayor acceso a los nutrientes (N, P y CO₂) presentes en el medio y, por lo tanto, tener mayor capacidad para la asimilación y eliminación de nutrientes de las aguas residuales [75]. La eficiencia fotosintética (expresada como la energía solar convertida en biomasa) en las plantas terrestres se encuentra entre el 1,8 y el 2,2%, mientras que en las microalgas es del 6-8% [86, 87]. Las microalgas también presentan velocidades de crecimiento entre 5 y 10 veces superiores a las plantas terrestres [88]. Tanto la mayor eficiencia fotosintética, como la mayor velocidad de crecimiento favorecen su propagación en las aguas residuales durante el proceso de biorremediación. Otra ventaja de las microalgas es que pueden ser cultivadas en terrenos pobres no aptos para la agricultura, por lo que no compiten por la tierra con los cultivos alimentarios [89].

Aparato fotosintético

La capacidad para la biorremediación de las aguas por parte de las microalgas se basa en su metabolismo fotosintético. La fotosíntesis se define como un conjunto de rutas metabólicas anabólicas mediante las cuales los organismos fotoautótrofos sintetizan biomoléculas, empleando la energía lumínica para la reducción del CO_2 atmosférico produciendo como subproducto oxígeno (Reacción 2.6). Desde un punto de vista fisiológico, la fotosíntesis comprende dos rutas metabólicas conocidas tradicionalmente, y erróneamente, como “Fase Lumínica” y “Fase Oscura”. En la actualidad, esta terminología está en desuso ya que la fase “oscura” ocurre tanto en presencia o ausencia de luz y han sido sustituidas por los términos “fotoquímica” o reacción de Hill para referirse a la fase lumínica, y “biosintética” o ciclo de Benson-Calvin para la fase oscura.



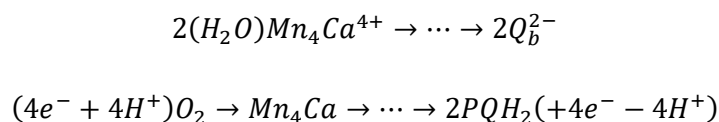
Reacción 2.6. Reacción general de la fotosíntesis.

La fotosíntesis se realiza en unos orgánulos específicos llamados cloroplastos. Estructuralmente los cloroplastos están compuestos por una doble membrana donde se encuentra todo el aparato fotosintético.

Fase fotoquímica o reacción de Hill

La reacción de Hill consiste en una serie de reacciones bioquímicas de óxido-reducción que tienen lugar en la membrana de los tilacoides. Los fotones de la luz solar, con una longitud de onda entre 400 y 700 nm, al incidir sobre el complejo antena del Fotosistema II (PSII) provocan la excitación y oxidación de los átomos de magnesio del centro reactivo del PSII. La pérdida de electrones de este complejo genera el potencial suficiente para desencadenar la lisis de la molécula de agua. Esta rotura de la molécula del agua ocurre en el lumen de los tilacoides gracias a un “cluster” de oxidación formado por 4 átomos de manganeso (Mn_4Ca) que, al perder electrones, adquiere potencial oxidativo para romper 2 moléculas de agua. En este proceso se liberan 4 protones (H^+), 4 electrones (e^-) y una molécula de oxígeno (Reacción 2.7). Los átomos

de manganeso ceden los electrones a las moléculas de clorofila del PSII, recuperando así su estado basal, quedando preparadas para el siguiente ciclo de excitación [90].



Reacción 2.7. Resumen del mecanismo de óxido-reducción del clúster de Mn y de la plastoquinona (Q_b/PQH_2) [90].

En la fase fotoquímica se obtienen como productos finales ATP y $NADPH+H^+$, es decir, la energía y el poder reductor requerido para poder fijar el carbono atmosférico y sintetizar nueva biomasa. Como subproducto de esta primera etapa se genera oxígeno, que puede ser utilizado por las bacterias heterótrofas durante el tratamiento de las aguas residuales.

Fase biosintética o ciclo de Benson-Calvin

En esta fase de la fotosíntesis, el carbono atmosférico en forma de CO_2 , se utiliza para sintetizar macromoléculas que constituirán la nueva biomasa. Esta fase se realiza mediante la ruta metabólica conocida como ciclo de Benson-Calvin.

La carboxilación, fijación de la molécula de CO_2 , está catalizada por la enzima central del ciclo de Benson-Calvin, la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). Se denomina carboxilasa/oxigenasa puesto que, además de permitir la fijación de una molécula de CO_2 (carboxilación) a la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), tiene la capacidad de catalizar también la fijación de oxígeno sobre la RuBP. Esta oxigenación ocurre en un proceso denominado fotorrespiración, que termina liberando CO_2 y disipando energía.

2.3.4. Parámetros que afectan en el tratamiento de agua residual

La depuración de aguas residuales utilizando consorcios de microalgas-bacterias depende de múltiples factores como son la biodisponibilidad de nutrientes (N, P y C), la temperatura, el pH, la intensidad lumínica, la concentración de oxígeno disuelto (OD), el tiempo de retención

hidráulica (TRH) y el diseño y geometría del fotobiorreactor empleado (Figura 2.6). Todos estos factores influyen en el desarrollo de los microorganismos, afectando su productividad y la eliminación de nutrientes del agua residual [91].

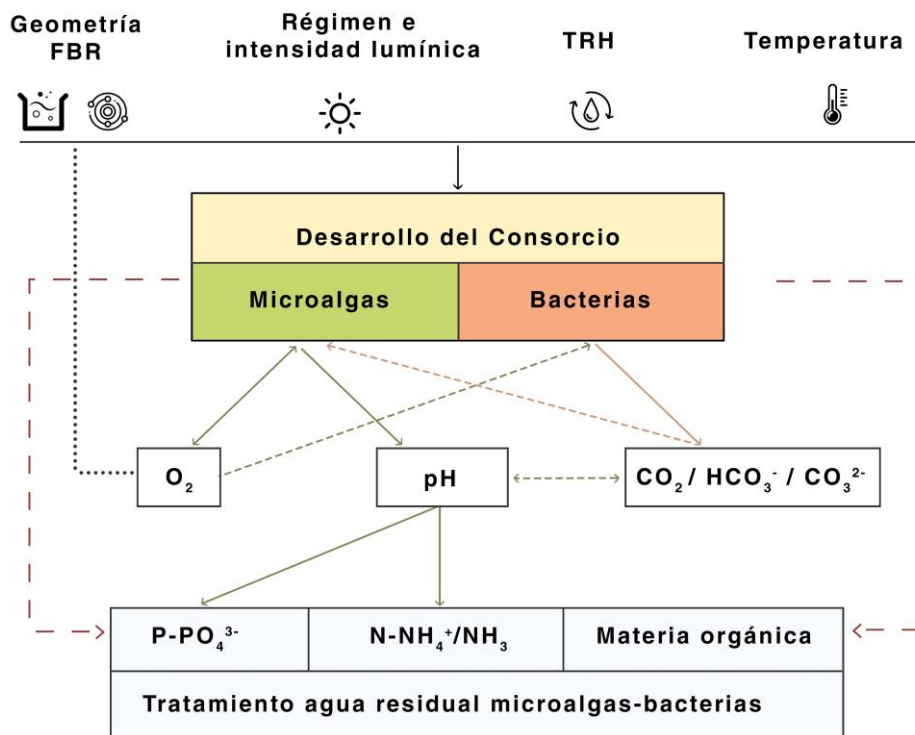


Figura 2.6. Esquema de las implicaciones de los parámetros de cultivo de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de las aguas residuales.

Efecto del pH y eliminación de los nutrientes (C, N y P)

Las microalgas no asimilan del mismo modo las distintas formas químicas en la que se encuentra el C, N y P [92]. El pH tiene un efecto determinante sobre las formas químicas en las que se encuentran los nutrientes en el efluente en el cual se desarrollan las microalgas. Es por ello que, a pesar de que un determinado elemento pueda encontrarse en el medio en una concentración elevada, puede que no esté biodisponible para una correcta asimilación por parte de las microalgas. La biodisponibilidad de los nutrientes presentes en las aguas residuales está sujeta a las fluctuaciones del pH.

Carbono, C

El carbono es el elemento más abundante en la biomasa de las microalgas, el cuál puede llegar a suponer hasta el 65% de su peso seco ya que forma parte de todos los compuestos orgánicos [92]. Las microalgas fijan el carbono inorgánico (CO_2) presente en su entorno gracias a la actividad de la enzima RuBisCO. La actividad de dicha enzima está determinada por distintos factores como la disponibilidad de CO_2 , la proporción de la concentración de CO_2/O_2 y, la concentración de la enzima, la cantidad de RuBP y estado de activación de la RuBisCO [90].

Para los organismos fotosintéticos terrestres, si consideramos condiciones atmosféricas normales con presiones parciales de O_2 y CO_2 del 21% y 0,04% respectivamente, la concentración de CO_2 no es limitante. La afinidad de la RuBisCO por el CO_2 , medida a través de la constante de Michaelis-Menten (K_m), es de 10-15 μM frente a 25 μM que posee para el O_2 . Por ello, aunque la relación CO_2/O_2 sea baja, la concentración del CO_2 es suficiente para permitir la carboxilación. Sin embargo, los organismos fotosintéticos en el agua no tienen acceso al CO_2 de la atmósfera y lo deben encontrar disuelto en la misma. El carbono inorgánico (CI) en las aguas residuales suele encontrarse en concentraciones de entre 50 y 100 mg L^{-1} [13], superior a la concentración en equilibrio con la atmósfera (15 mg CI L^{-1} según la ley de Henry a 1 atm y una presión parcial de CO_2 de 0,04%). La biodisponibilidad de C en las aguas residuales es un factor limitante para el crecimiento fotosintético, ya que aunque el CO_2 es soluble, en el medio acuático experimenta rápidamente transformaciones que hacen que no se encuentre en forma de CO_2 , sino en forma de iones intermedios como bicarbonato (HCO_3^-) o carbonato (CO_3^{2-}). A valores de pH próximos a la neutralidad, el C puede encontrarse en forma de CO_2 (H_2CO_3) o de HCO_3^- (Figura 2.7). Puesto que en el ciclo de Benson-Calvin, el carbono sólo puede ser incorporado en forma de CO_2 , en las aguas con pH básico se dificulta la carboxilación ya que el carbono tiende a encontrarse en formas poco asimilables, principalmente CO_3^{2-} [80, 92].

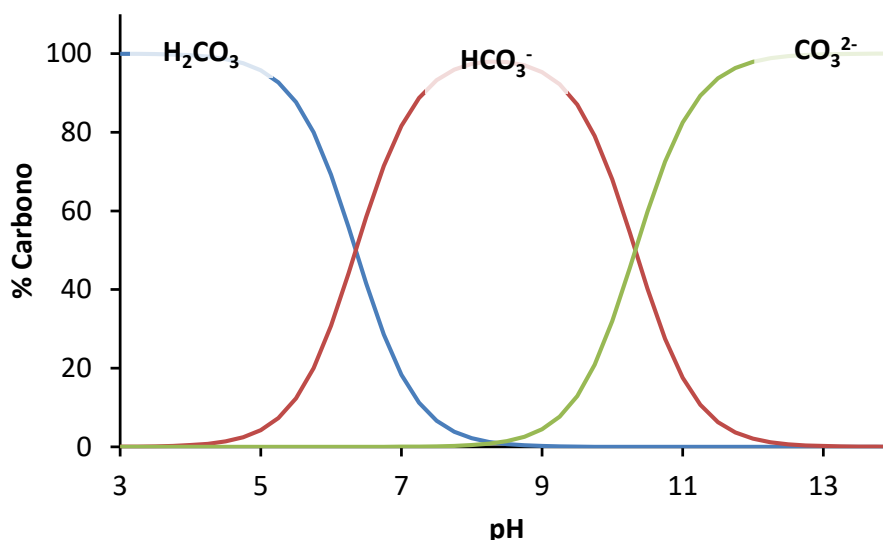


Figura 2.7. Equilibrio de H_2CO_3 (—), HCO_3^- (—) y CO_3^{2-} (—) en función del pH [80].

La disponibilidad de carbono para la fotosíntesis en el medio acuático puede verse aún más limitada debido al efecto alcalinizante que produce la fotosíntesis como consecuencia del consumo de HCO_3^- . Es por ello que el pH es un parámetro clave en el tratamiento de aguas basado en los consorcios microalgas-bacterias.

El aumento de pH se debe a la disminución de la concentración de HCO_3^- , que a su vez va acompañada de una disminución en la concentración de protones (H^+) [47]. Según el carbono es incorporado por parte de la biomasa algal, su concentración en el agua puede ser restituida por difusión molecular del CO_2 atmosférico o puede ser repuesto por el sistema de alcalinidad a través de la disociación de bicarbonato. Durante el día, y con el aumento de la intensidad lumínica (entendida como la cantidad de fotones que llegan a una superficie por unidad de tiempo), el proceso fotosintético puede reducir considerablemente los niveles de HCO_3^- libre, resultando en un aumento del pH hasta valores próximos a 11 [93]. El pH básico afecta a las formas químicas del CI favoreciendo la presencia de CO_3^{2-} , que es difícilmente asimilable por la mayor parte de las especies de microalgas.

Nitrógeno, N

El nitrógeno es un elemento imprescindible para el desarrollo de las microalgas ya que lo precisan para la síntesis de aminoazúcares, proteínas y ácidos nucleicos. Las microalgas se caracterizan por tener un elevado contenido en forma de proteínas, porcentaje que puede

superar el 50% de su peso seco [94, 95]. Por lo tanto, el contenido en nitrógeno de la biomasa de las microalgas suele estar comprendido entre el 1 y el 10% de su peso seco [92]. Las aguas residuales urbanas, como se mencionó en el Apartado 2.1.2 (Tabla 2.2, Pág. 12), son un medio rico en este elemento, consecuentemente pueden satisfacer los requerimientos de nitrógeno para el cultivo de microalgas. Cabe destacar que el contenido en nitrógeno de la biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales urbanas suele ser próxima al 5% [41, 95]. En estos efluentes el nitrógeno puede encontrarse en diversas formas químicas: NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , NH_3 , proteínas y otros compuestos orgánicos. El NH_4^+ es la especie química más sencilla de asimilar por las microalgas debido a que su aprovechamiento requiere menos energía. Tanto el NO_2^- como el NO_3^- deben ser reducidos a NH_4^+ para la utilización por la microalga, por lo que en este proceso se invierte energía metabólica (Figura 2.8) [96, 97].

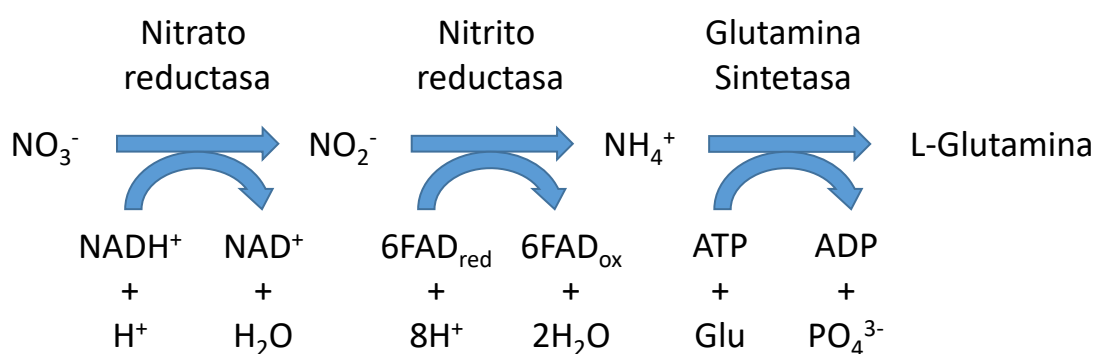


Figura 2.8. Esquema simplificado de la asimilación de N inorgánico [97].

La concentración de NO_2^- y NO_3^- dependerá del origen y composición de las aguas residuales, así como de la actividad nitrificante que se desarrolle en el influente (Pág. 18). La concentración de NH_4^+ dependerá de la composición del agua y del pH que afectará equilibrio $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (Figura 2.9). Cuánto más básico sea el pH, mayor será la cantidad de N que se encuentre en forma de NH_3 , dificultando su asimilación por parte de los microorganismos y fomentando la pérdida de éste por volatilización [98, 99]. Además, el NH_3 en altas concentraciones (superiores a 100 mg L^{-1}) puede resultar tóxico para las microalgas puesto que provoca el desacoplamiento del PSII de la cadena de transporte de electrones [100].

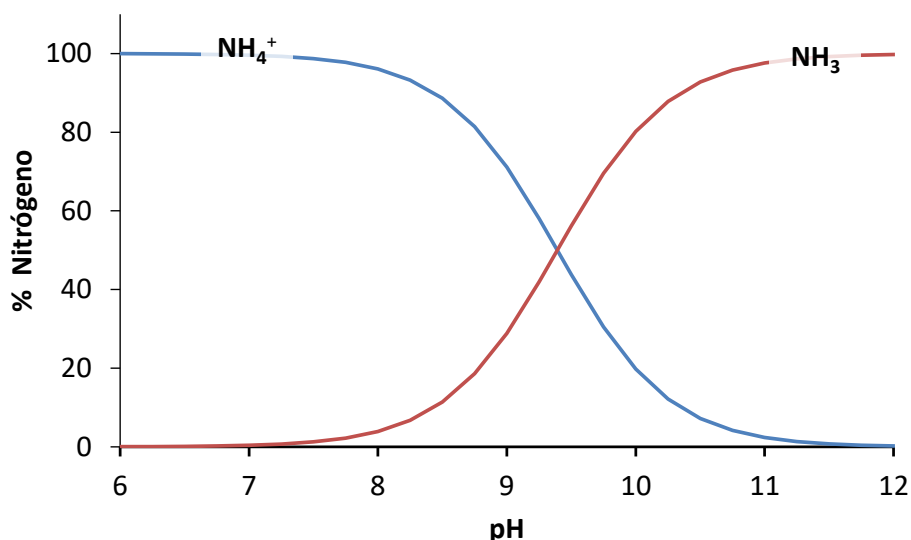


Figura 2.9. Equilibrio de NH_4^+ (—) y NH_3 (—) en función del pH.

Los pH básicos (superiores a 8,3), característicos de los efluentes tratados con microalgas como consecuencia de la actividad fotosintética, hacen que disminuya la actividad de las poblaciones bacterianas típicas del tratamiento de agua convencional y, por lo tanto, el pH también puede afectar a la eliminación de nutrientes [101]. Las bacterias de los fangos activos, que son empleadas para la oxidación de materia orgánica, pueden tolerar niveles de pH entre 6 y 9, estando el óptimo en torno a la neutralidad [13]. El decaimiento de las bacterias del fango activo como consecuencia del pH básico se traduce en menores tasas de eliminación de materia orgánica. Por lo tanto, el decaimiento de las bacterias heterótrofas también genera menores producciones de CO_2 que afecta a la tasa de carboxilación y, por tanto, a un menor crecimiento de los microorganismos fotosintéticos.

Fósforo, P

El P es un elemento indispensable para el desarrollo de las microalgas ya que lo precisan para la síntesis de ácidos nucleicos, intermediarios energéticos (ATP) y para la síntesis de fosfolípidos. Como consecuencia, las microalgas en condiciones normales pueden llegar a almacenar P hasta el 3,3% de su peso seco. Powell *et al.* [102] describieron situaciones en las que las microalgas pueden acumular hasta un 4% de P en forma de biomasa a través de un mecanismo conocido como *luxury up-take* de P en forma de polifosfatos, bioproceso similar al descrito para los OAF (Pág. 18) [47]. La asimilación de fósforo por las microalgas y, por tanto, su

eliminación de las aguas residuales va a estar estrechamente relacionada con la temperatura, la radiación solar, el TRH y el pH del medio [103]. En los consorcios formados por microalgas-bacterias, la eliminación del P se realiza mediante dos mecanismos. Uno de los mecanismos consiste en la asimilación directa para formar biomasa y el segundo en la precipitación química [92]. La acción fotosintética, debido a la asimilación de CO_2 , genera un aumento en el pH, que en presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , causa la precipitación del P en forma de hidroxiapatita o estruvita [47]. Al igual que ocurre con el nitrógeno y el carbono, las distintas formas en las que se encuentra el fósforo depende del pH de las aguas. Las formas en las que se pueden encontrar los fosfatos en un medio líquido son el H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} (Figura 2.10). El pH es un parámetro importante ya que las formas de fosfatos preferentemente asimilables por las microalgas son el H_2PO_4^- y el HPO_4^{2-} [104].

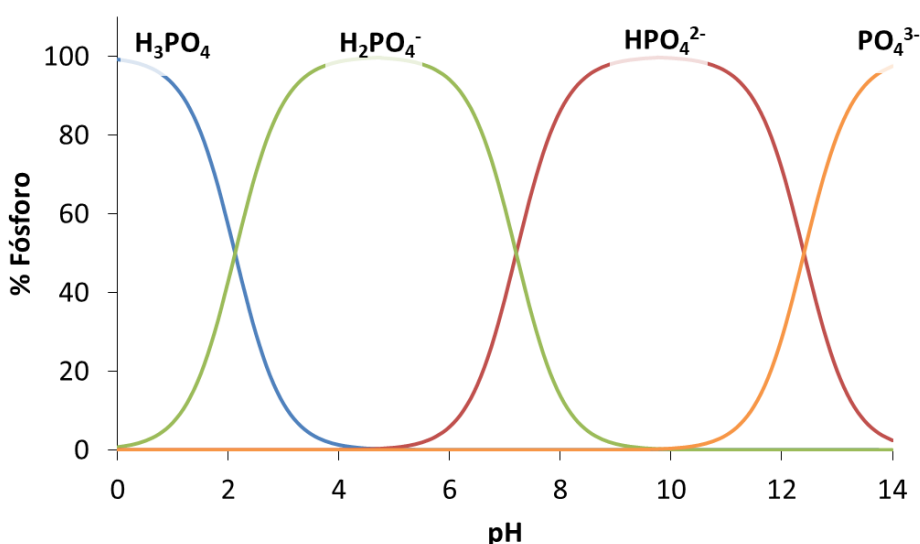


Figura 2.10. Equilibrio de H_3PO_4 (—), H_2PO_4^- (—), HPO_4^{2-} (—) y PO_4^{3-} (—) en función del pH.

Efecto del Tiempo de residencia hidráulica (TRH)

El tiempo de residencia hidráulico, TRH, es el tiempo en el que un volumen de agua que entra en un depósito tarda en abandonar el mismo. En el tratamiento de aguas residuales, el empleo de un TRH más corto o más largo dependerá de la composición del agua residual y de la época del año ya que ésta determina la temperatura e intensidad lumínica. Estos parámetros

afectan a la concentración de la biomasa, a las especies desarrolladas, al ratio microalga-bacteria y a la eficiencia de eliminación de contaminantes [105].

En el tratamiento de aguas mediante consorcios de microalgas-bacterias, se considera necesario operar los FBRs con TRH entre 2 y 10 días [70, 106-108]. Esto se debe, fundamentalmente, a la velocidad con la que los integrantes de los consorcios microalgas-bacterias se desarrollan. En los sistemas que no cuentan con mecanismos de recirculación de fangos es necesario operar los reactores con un TRH superior a la velocidad de crecimiento (μ) de los microorganismos (Tabla 2.5). El TRH debe ser suficientemente alto para evitar el “lavado” de los microorganismos. Se entiende por “lavado del reactor” a la pérdida de los microorganismos encargados del bioproceso por un régimen hidráulico inferior al tiempo mínimo de duplicación. Como ejemplo de la importancia de este parámetro, Arcila y Buitrón [70] desarrollaron un estudio en el que compararon diferentes TRH (2, 6 y 10 días) en un *raceway* de 80 L sin sistemas de recirculación de fango y aplicando una misma intensidad lumínica. En este trabajo se obtuvieron eliminaciones de materia orgánica (DQO) superiores al 92%, de nitrógeno (N-NH_4^+) del 85% y de fósforo (P-PO_4^{3-}) del 30% con los TRH más largos (10 días). En los ensayos operados con el TRH más bajo (2 días), los resultados fueron sensiblemente peores y solo se eliminaron el 12, 15 y 9% de la materia orgánica, nitrógeno y fósforo, respectivamente [70].

En el tratamiento de aguas a escalas piloto/demostración, la época del año es el parámetro que determina el TRH aplicado en los FBRs en latitudes alejadas del ecuador. Por ejemplo, en los meses invernales, con menores temperaturas e intensidades lumínicas, los TRH a los que deben operarse los FBRs suelen estar comprendidos entre los 6 y 10 días [61, 99, 107]. En cambio, durante los meses estivales, al registrarse mayores productividades fotosintéticas, los TRH pueden reducirse hasta los 2-4 días [70, 107].

Tabla 2.5. Características metabólicas y fisiológicas de los microorganismos involucrados en el proceso de tratamiento de aguas basado en los consorcios microalgas-bacterias.

Microorganismos	Substratos consumidos	Subproductos generados	Velocidad específica de crecimiento μ (d^{-1})	Velocidad específica de duplicación (d)
Microalgas	CO_2 , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , fotones	O_2	0,11-1,22 ^{a-b}	0,82-10 ^{a-b}
Bacterias heterótrofas aerobias	Materia orgánica, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} ,	CO_2	3-6 ^c	0,3-0,7 ^c
Bacterias aerobias autótrofas nitrificantes	NH_4^+ , O_2 , CO_2	NO_2^- , NO_3^-	0,3-1 ^c	1,0-3,3 ^c
Bacterias anóxicas heterótrofas desnitrificantes	Materia orgánica, NO_3^-	N_2	0,05-0,1 ^c	10-20 ^c

^{a)} Massimi y Kirkwood [109]

^{b)} Sydney *et al.* [110]

^{c)} Metacalf [13]

Efecto de la temperatura e intensidad lumínica

Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros que más influyen en el crecimiento de las microalgas al afectar a la velocidad de crecimiento, la tasa de división celular y a la velocidad fotosintética. Aunque cada especie presenta su rango de temperatura de crecimiento, generalmente está comprendido entre los 5 y los 30°C [111] (Figura 2.11). Dentro de este rango, se denomina temperatura óptima de crecimiento aquella en la que el microorganismo crece a su máxima velocidad. Para las microalgas la temperatura óptima está suele estar comprendida entre los 20 y los 25°C [112]. En el caso de las especies de algas verdes del género *Chlorella*, alga que generalmente se encuentra en el tratamiento de aguas residuales, el rango de temperatura a la que puede desarrollarse suele encontrarse entre los 15 y los 35°C, estando el óptimo en los 25°C [113-115]. Dentro de los rangos de tolerancia, la velocidad de crecimiento aumenta con el aumento de temperatura, debido a un aumento de la actividad de las enzimas del ciclo de Benson-Calvin [111, 116].

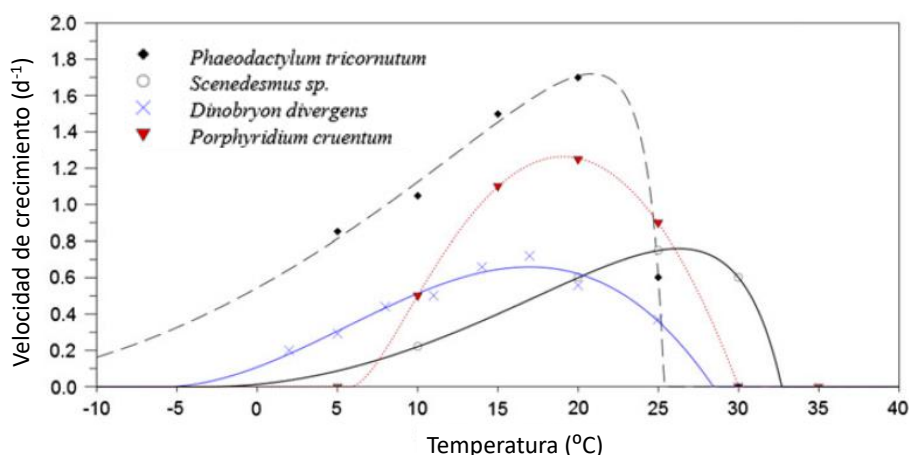


Figura 2.11. Ejemplo de los rangos de temperatura de crecimiento de algunas microalgas [111].

Al sobrepasarse la temperatura óptima de crecimiento, la velocidad fotosintética y de división celular decae bruscamente debido principalmente a la inhibición y desactivación de las enzimas fotosintéticas [117]. Como consecuencia de las fluctuaciones de temperatura registradas durante el día, al igual que ocurre con el pH y el oxígeno, se generan cambios en los parámetros fisiológicos de las microalgas, haciendo que los microorganismos se encuentren en situaciones que van desde el crecimiento óptimo a situaciones de estrés celular (Figura 2.11).

Normalmente, las temperaturas estivales que se alcanzan en muchos países de clima templado, pueden inhibir el crecimiento de las microalgas en instalaciones situadas en el exterior. El control de la temperatura en los sistemas de producción resulta inviable por su elevado coste y gasto energético. Béchet *et al.* [118] estimaron la cantidad de energía necesaria para disminuir la temperatura de operación de 40 a 25°C en FBRs tubulares de 50 L en 18.000 GJ año⁻¹ ha⁻¹. Este gasto energético, según Béchet *et al.*, conllevaría el consumo de 476 t de diésel año⁻¹ ha⁻¹ [118]. Los sistemas de cultivo abiertos, en comparación con los sistemas tubulares, permiten una mayor disipación de la energía térmica a través de la evaporación del agua. Pero incluso, a pesar del efecto de la evaporación, durante los meses estivales en los sistemas abiertos tipo *raceway* se pueden alcanzar los 40°C [118, 119]. La instalación de sistemas de refrigeración complementarios implicaría elevados costes energéticos que dificultarían la implementación de esta tecnología a nivel comercial. Las elevadas temperaturas durante las horas de mayor radiación solar (Figura 2.12), no solo pueden afectar la actividad de las enzimas fotosintéticas, sino también reducen la solubilidad del CO₂, disminuyendo la producción de biomasa y la eliminación de nutrientes [47, 120].

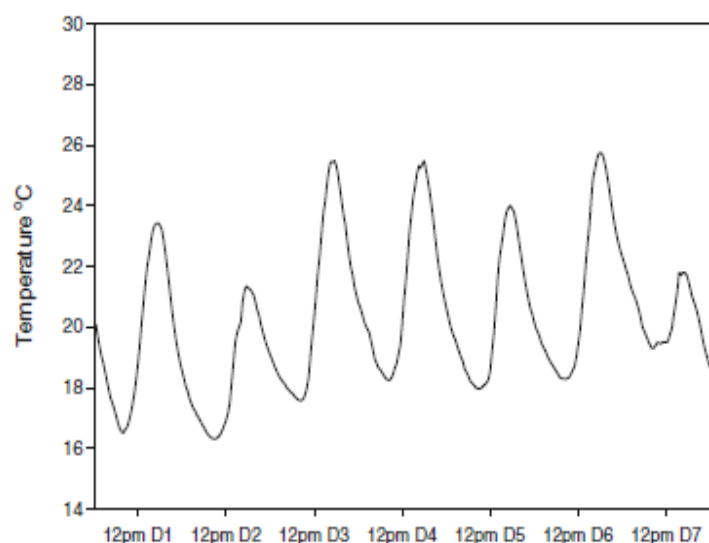


Figura 2.12. Ejemplo de la variación diurna de temperatura en FBRs tipo *raceway*, figura obtenida de los resultados presentados por Sutherland *et al.* [121].

Intensidad lumínica

Además del CO_2 , los principales substratos de la fotosíntesis son el agua y los fotones dentro del rango de longitud de onda visible. El agua no suele ser un componente limitante en el proceso de tratamiento de aguas residuales con microalgas, pero la disponibilidad de los fotones si puede serlo. La disponibilidad de luz es considerada como uno de los principales factores que determinan el rendimiento de un proceso de producción fotosintético y, por lo tanto, afecta también a la depuración de aguas residuales. La iluminación que alcanza al cultivo, según su intensidad, puede ser: (i) limitante para el desarrollo de las microalgas, (ii) estar comprendida en el rango de saturación o (iii) incluso provocar la foto-inhibición (Figura 2.13) [91]. Para la implementación de estas tecnologías a escala industrial es necesario determinar las tasas de actividad biológica en función de la intensidad de luz.

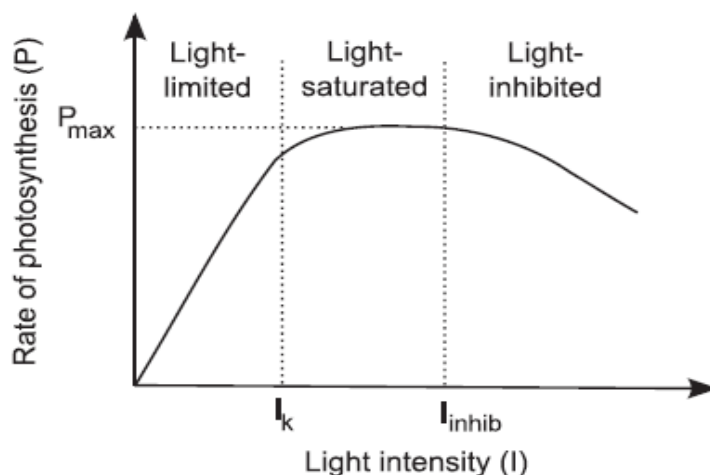


Figura 2.13. Relación típica entre la intensidad lumínica y la velocidad fotosintética [91].

A bajas intensidades lumínicas la fotosíntesis está limitada por la cantidad de fotones que llegan a los centros catalíticos del cloroplasto y la velocidad fotosintética suele ser directamente proporcional a la intensidad de luz que recibe el cultivo (Figura 2.13). Cuando la intensidad de luz alcanza límites de saturación, la fotosíntesis comienza a estar limitada por la cantidad de centros catalíticos disponibles, los fotosistemas. En estas condiciones la velocidad de las reacciones no aumenta por falta de centros catalíticos. A mayores intensidades lumínicas se alcanzan valores de inhibición, con reducciones de la velocidad de reacción como consecuencia de la desactivación de las proteínas de la cadena de transporte tilacoidal [91].

Puesto que la absorción de la luz ocurre únicamente en las capas superficiales del cultivo, al aumentar la profundidad o el diámetro de los reactores cilíndricos, la intensidad lumínica decae exponencialmente. La disminución de la intensidad lumínica en el cultivo está definida por la ley de Lambert-Beer y depende de la concentración celular o de los sólidos suspendidos, del paso de luz (profundidad o diámetro del reactor) y de la intensidad lumínica sobre la superficie. Por lo tanto, la intensidad lumínica también depende del momento del día y de la estación del año en la que se opere el sistema [122].

A pesar de la importancia que tiene la disponibilidad de luz en los sistemas de depuración de agua que utilizan microalgas, no hay un consenso claro sobre la expresión matemática que debe utilizarse para predecir de manera adecuada el efecto de la intensidad lumínica sobre la velocidad de fotosíntesis. Tampoco lo hay para definir el parámetro que cuantifique esta velocidad. Hay autores que cuantifican la fotosíntesis como la producción de oxígeno durante la reacción de Hill, otros utilizan la velocidad de crecimiento del microorganismo [91] y otros lo hacen en función de la producción de biomasa o en la acumulación de azúcares [123].

En cuanto a los modelos matemáticos empleados tampoco hay un consenso claro, hay autores que emplean modelos hiperbólicos tangentes (Poisson, Monod) o modelos en los que se incorpora la inhibición por luz [91], aunque todos ellos generan una respuesta similar (Figura 2.13). Por ejemplo, Jassby y Platt [124] compararon ocho expresiones matemáticas, concluyendo que la mejor de ellas consistía en un modelo hiperbólico tangente. Los modelos tipo Monod consideran la intensidad lumínica como un substrato más de la fotosíntesis microalgal, como se aprecia en la Ecuación 2.1. Dónde P es la velocidad específica de la fotosíntesis, P_m es la velocidad fotosintética máxima, I es la intensidad lumínica que llega a las células e I_k es una constante que representa la intensidad lumínica requerida para alcanzar la P_m [91, 125].

$$P = P_m \frac{I}{I_k + I}$$

Ecuación 2.1. Velocidad específica de la fotosíntesis con un modelo tipo Monod.

Entre los modelos tipo Monod, una de las ecuaciones más empleadas es la descrita por el profesor Molina-Grima *et al.* (Ecuación 2.2, [122]). En esta expresión, los autores calcularon los valores de la intensidad lumínica dentro del cultivo empleando una adaptación de la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 2.3, Figura 2.14) para FBRs cilíndricos como los descritos en la Apartado 3.1.3 (Pág. 67). La velocidad de producción de oxígeno se usa como parámetro para cuantificar la actividad biológica. Este modelo fue el seleccionado para describir la producción de OD en los experimentos de la presente tesis doctoral [122].

$$RO_{2Pho} = \left(\frac{RO_{2Max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \right)$$

Ecuación 2.2. Modelo propuesto por Molina-Grima *et al* [122].

Dónde RO_{2Pho} es la velocidad de producción de oxígeno, RO_{2Max} es la velocidad máxima de producción de oxígeno, específica para cada cepa, I_{av} es la intensidad lumínica media dentro del reactor, I_k es la constante de saturación lumínica media, y n es un parámetro formal,

adimensional, requerido para el ajuste experimental. A su vez el parámetro I_{av} queda definido por la siguiente expresión:

$$I_{av} = \frac{I_0}{K_a p C_b} (1 - \text{Exp}(-K_a p C_b))$$

Ecuación 2.3. Adaptación de la ley de Lambert-Beer para promediar la intensidad lumínica en un medio líquido.

Dónde I_0 es la intensidad lumínica sobre la superficie del reactor, K_a es el coeficiente de extinción de la luz en un medio líquido, que se determina experimentalmente (p.e. $0,15 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), la p se corresponde con el paso de luz, distancia que tiene que recorrer el haz de luz hasta alcanzar determinado punto y la C_b con la concentración de los sólidos en el reactor.

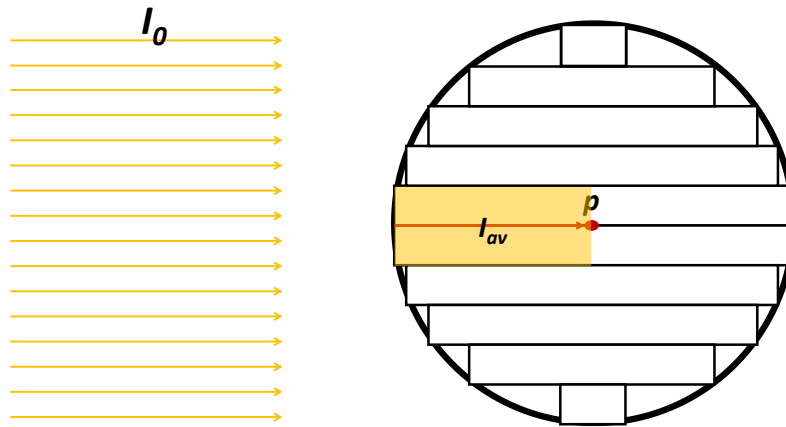


Figura 2.14. Diagrama de la determinación de la intensidad lumínica en un punto determinado de un FBR cilíndrico. El cilindro puede ser entendido como una sucesión de prismas cuadrangulares donde la intensidad lumínica es resultado de la longitud (p) y concentración de biomasa (C_b).

En 1982 Aiba *et al.* [126] desarrollaron un modelo por inhibición por sustrato (Ecuación 2.4), obtenido a partir de los resultados de respuesta a intensidad de luz encontrados en sus experimentos (Figura 2.15). Dónde P se corresponde con la velocidad de producción de oxígeno por unidad celular (también expresada por unidad de clorofila a). La I es la intensidad lumínica y la a' , b' y c' se corresponden con constantes empíricas.

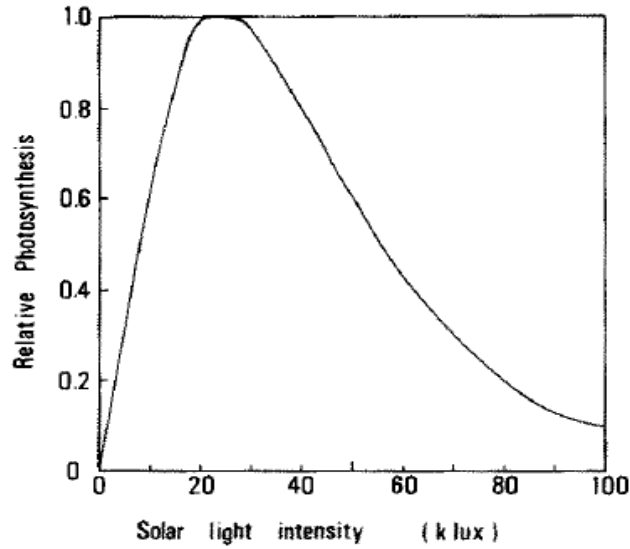


Figura 2.15. Respuesta fotosintética frente a la intensidad solar obtenida a partir de los datos promediados con algas planctónicas marinas por Ryther [126, 127].

$$P = \frac{I}{a' + b'I + c'I^2}$$

Ecuación 2.4. Modelo propuesto por Aiba *et al.* que incorpora la inhibición por efecto de la intensidad lumínica [126].

A partir del modelo de Aiba *et al.* [126], la foto-inhibición (I_i) fue también incluida por Molina-Grima *et al.* [54] modificando el modelo previamente mencionado (Molina-Grima *et al.* [122], Ecuación 2.2) al detectar que la velocidad de producción de oxígeno (RO_{2Pho}) disminuía a determinadas intensidades. En este caso, se propuso la Ecuación 2.5, donde los parámetros formales n y m permiten un ajuste a los datos experimentales.

$$RO_{2Pho} = \left(\frac{RO_{2Max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n + \frac{I_{av}^m}{I_i}} \right)$$

Ecuación 2.5. Adaptación de la Ecuación 2.2 incorporando el efecto de la inhibición por intensidad lumínica.

Otros autores como Blanket *et al.* [123] desarrollaron un modelo que relacionaba la intensidad lumínica con la producción de azúcares en los cloroplastos a través de la modificación del modelo hiperbólico tangente de Jassby y Platt (Ecuación 2.6) [124]. Dónde: q_s es la velocidad de producción de azúcares, $q_{s,m}$ la velocidad máxima de producción de azúcares e $Y_{s/ph}$ el rendimiento de la producción de azúcar por fotón incidente. La q_{ph} se corresponde con la velocidad de absorción de fotones. Con los valores obtenidos de la q_s , los autores pudieron determinar el consumo de los azúcares en la respiración.

$$q_s = q_{s,m} \cdot \tanh \left(\frac{q_{ph} \cdot Y_{s/ph}}{q_{s,m}} \right)$$

Ecuación 2.6. Determinación de la velocidad de producción de azúcares según Blanket *et al.* [123].

En otros estudios se consideran además otros fenómenos que ocurren durante el cultivo como puede ser la pérdida de biomasa durante la noche por la respiración endógena. De hecho, en 2016, Huesemann *et al.* [128] incorporaron el efecto de la intensidad lumínica y la temperatura en la pérdida de biomasa como consecuencia de la respiración endógena de las microalgas.

Concentración de oxígeno

En condiciones de concentraciones de oxígeno superiores a las concentraciones atmosféricas (presión parcial de 21% de O_2), los organismos fotosintéticos (entre ellos las microalgas) realizan una ruta metabólica conocida como fotorrespiración. En 1920, Warburg realizó los primeros experimentos con el alga verde *Chlorella* para estudiar el efecto inhibitorio del oxígeno en la fotosíntesis [90]. A concentraciones de O_2 disuelto próximas a la saturación atmosférica, en torno a 8 mg L^{-1} (21% de oxígeno), la enzima RuBisCO es capaz de secuestrar 3-4 moléculas de CO_2 por cada una de O_2 . Esta actividad aumenta cuanto mayor es la presión parcial del oxígeno.

La fotorrespiración funciona al mismo tiempo que el Ciclo de Benson-Calvin y contribuye a un amplio rango de procesos en el cloroplasto, desde bio-energéticos hasta del metabolismo

del C y de asimilación de N. La fotorrespiración se inicia en el cloroplasto, cuando la RuBisCO fija el O₂ a la RuBP y se produce 3-fosfoglicerato y fosfoglicolato. Este ciclo metabólico se denomina ciclo del glicolato y consume ATP y poder reductor (NADPH) desprendiendo una molécula de CO₂ que ha sido fijada anteriormente (aproximadamente el 25% [90, 129]) y N-NH₄⁺ [130].

La fotorrespiración se potencia cuando la presión parcial de O₂ aumenta. En el estudio realizado por Ogawa *et al.* [131] con *Chlorella vulgaris*, se apreciaron disminuciones en el rendimiento de producción de biomasa y la velocidad de crecimiento a diferentes concentraciones de O₂ (0, 8,32 y 27,04 mg O₂ L⁻¹). Estos autores observaron que a concentraciones de 27 mg O₂ L⁻¹ se reducía el rendimiento en biomasa en un 30% y la velocidad de crecimiento en un 28%. Otro estudio, realizado con *Chlorella pyrenoidosa* por Shelp y Canvin [132], mostró inhibiciones de la fotosíntesis del 12% y del 24% a concentraciones de O de 20,8 y 41,6 mg O₂ L⁻¹, respectivamente. Märkl y Mather [133], en experimentos realizados con *C. vulgaris*, observaron que en medios saturados con O₂ puro (41,6 mg O₂ L⁻¹) se obtenían disminuciones de la tasa fotosintética del 35%, encontrando que en ausencia de oxígeno la tasa fotosintética aumentaba un 14%. Según estos estudios se concluye que, cuanto menor es la concentración del O₂, mayor es la tasa fotosintética, la tasa de crecimiento y el rendimiento fotosintético en los FBRs.

El efecto negativo sobre la producción de biomasa de las altas concentraciones de oxígeno ha sido incluido en algunos modelos. En este contexto, Aiba *et al.* [126] desarrollaron la Ecuación 2.7.

$$1 - \frac{V}{V_{max}} = 1 - \frac{C_{CO_2}}{C_{CO_2} + K_m + (1 + C_{O_2}/K_i)}$$

Ecuación 2.7. Ecuación para determinar el efecto inhibitorio del oxígeno en la reacción de carboxilación según Aiba *et al.* [126].

Dónde V es la velocidad de carboxilación, moles CO₂ L⁻¹ s⁻¹, V_{max} se corresponde con la velocidad máxima de carboxilación, moles CO₂ L⁻¹ s⁻¹, C_{CO_2} es la concentración de CO₂ en el líquido, C_{O_2} es la concentración de oxígeno en el líquido, la K_m es la constante de Michaelis-Menten con respecto al CO₂, moles CO₂ L⁻¹, la K_i es la constante de equilibrio entre la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa y el inhibidor (O₂), en moles O₂ L⁻¹.

Otros autores han considerado el efecto nocivo del oxígeno incluyendo un factor de reducción sobre la propia tasa de producción de oxígeno. Para ello se asigna un valor de concentración de O_2 umbral a partir del cual ocurre la inhibición. Dicho factor es específico para cada cepa de microalga. La Ecuación 2.8 descrita por Costache *et al.* es un ejemplo de este tipo de modelos [134].

$$RO_{2Pho}[DO_2] = RO_{2Pho} \left(1 - \left(\frac{DO_2}{KO_2} \right)^z \right)$$

Ecuación 2.8. Determinación del efecto inhibitorio del producto de la reacción de Hill (oxígeno).

Donde DO_2 es la concentración del oxígeno disuelto (OD), KO_2 es el valor umbral de inhibición por oxígeno, determinado experimentalmente a través de la monitorización del OD y la z es un parámetro formal obtenido por ajuste a los datos empíricos.

La fotorrespiración es una ruta metabólica que genera pérdidas de C, N, energía y poder reductor, y además conlleva la generación de subproductos tóxicos. En condiciones de alta temperatura y excesiva oxigenación, la producción de biomasa de los organismos fotosintéticos se ve afectada negativamente y, por lo tanto, también disminuyen las tasas de asimilación y eliminación de nutrientes de las aguas en las que se cultivan estos microorganismos [64].

Aunque el fenómeno de la fotorrespiración ha sido principalmente descrito en cultivos de microalgas en medios sintéticos, este fenómeno puede ocurrir igualmente en reactores destinados a la depuración de aguas residuales. En sistemas *raceway*, la concentración de oxígeno puede alcanzar valores de hasta $40 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ [134, 135], siendo relativamente frecuente valores entre $25\text{-}30 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ en las horas de mayor insolación (mediodía) (Figura 2.16) [64]. Cabe destacar que, en sistemas abiertos, los niveles de saturación de oxígeno están muy condicionados por la configuración del reactor y las tasas de intercambio de éste con la atmósfera. Por ello, el control de la concentración de oxígeno es de gran importancia para maximizar el rendimiento de depuración [64, 136].

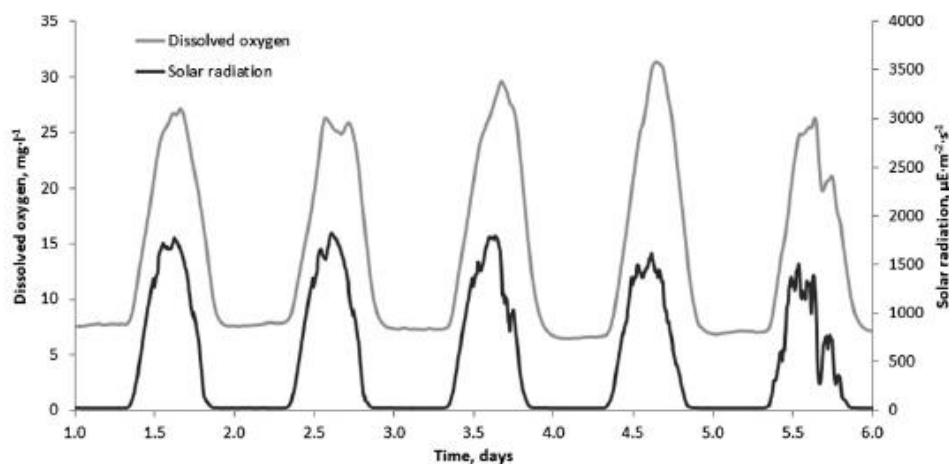


Figura 2.16. Intensidad solar y producción de OD en reactores abiertos a lo largo de 5 días consecutivos, [64].

En condiciones ideales, la concentración de O_2 no debería ser limitante para la degradación de materia orgánica, ni excesiva para evitar el fenómeno de la fotorrespiración. A pesar de la importancia de este parámetro, la concentración de este subproducto fotosintético no suele controlarse en los sistemas experimentales de tratamiento fotosintético de aguas residuales [136, 137]. En cambio, aspectos como las cinéticas de producción de O_2 , su acumulación y su dependencia de la intensidad lumínica y geometría del FBR han sido estudiadas en profundidad en sistemas desarrollados para obtener productos de alto valor añadido [64, 134, 138]. En estos modelos, los valores de O_2 registrados se emplean como indicadores del crecimiento de la biomasa de las microalgas ya que ambos parámetros se considera que están estequiométricamente relacionados [139]. La aplicación de estos modelos puede contribuir a su implementación y optimización del proceso, siendo uno de los objetivos específicos de esta tesis doctoral.

2.3.5. Consorcios microalgas-bacterias

Tradicionalmente, en estudios dedicados a cultivos de microalgas con fines biotecnológicos fuera del contexto de la depuración de efluentes, la presencia de bacterias se ha considerado una contaminación perjudicial para el proceso y fuente de inestabilidad para el sistema [140, 141]. Durante las últimas décadas, numerosos trabajos han ido modificando este concepto y hoy en día se considera al desarrollo conjunto de microalgas y bacterias como una ventaja en determinadas áreas relacionadas con la biotecnológica como es el tratamiento de

aguas residuales. Esto se debe a las relaciones mutualistas y simbióticas que se pueden dar entre ambos tipos de microorganismos [142-144].

Las microalgas, como describieron Oswald y Gotass en 1957, pueden aportar el oxígeno que las bacterias necesitan (Figura 2.2, Pág. 23) para la oxidación de materia orgánica (Reacciones 2.1 y 2.2, Pág. 16). De esta manera, se pueden reducir los gastos asociados a la aireación de los tanques aerobios de los sistemas de tratamiento de aguas convencionales [145]. Pero las relaciones entre las microalgas y las bacterias no se reducen únicamente al intercambio gaseoso de O_2/CO_2 , sino que también se establecen relaciones ecológicas que pueden favorecer o afectar la producción de biomasa y, por lo tanto, a la depuración de las aguas residuales.

El conocimiento de las asociaciones entre las bacterias y microalgas en los ecosistemas acuáticos es bastante limitado. Se han documentado algunas relaciones de parasitismo donde unas poblaciones viven a expensas de las otras. En el caso de parasitismo bacteriano sobre las poblaciones de microalgas, la muerte de las microalgas suele estar causada por la acción de enzimas glucosidasas, quitinasas y celulasas secretadas por las bacterias. Estas enzimas rompen las células de las microalgas liberando el contenido intracelular que utilizan las bacterias para alimentarse [146, 147]. Por otro lado, el crecimiento de ciertas bacterias puede verse afectado por los altos valores de pH, OD y temperaturas características de los tratamientos de aguas residuales con microalgas (Figura 2.17) [40, 47]. Algunas microalgas como las pertenecientes al género *Chlorella*, tienen la capacidad de producir moléculas bactericidas como la chlorelina, molécula que tiene una actividad antibacteriana sobre especies patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Figura 2.17) [148].

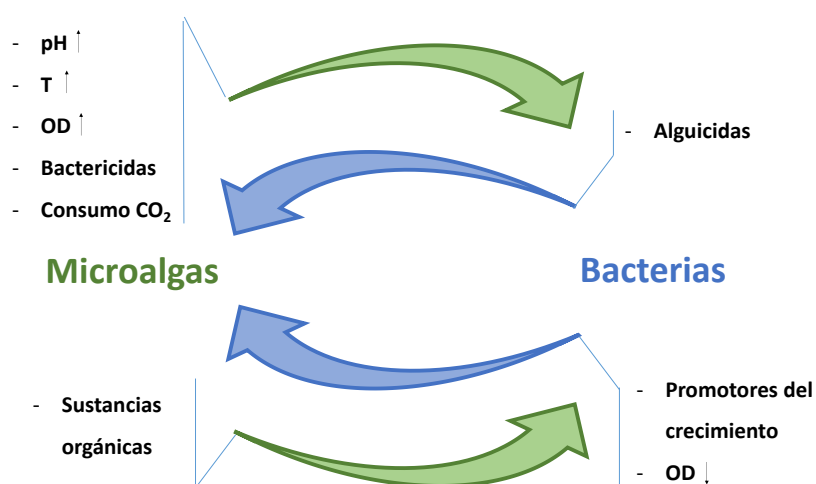


Figura 2.17. Esquema-resumen de las posibles interacciones entre microalgas y bacterias.

Sin embargo, a pesar de estos ejemplos de interacciones negativas, cada vez hay más evidencias de relaciones microalgas-bacterias basadas en el comensalismo y el mutualismo. Determinadas especies de bacterias tienen la capacidad de liberar al medio factores de crecimiento y fitohormonas como las auxinas (ácido-3-indolacético) [149] o vitaminas (biotina, tiamina o la cobalamina, B12) (Figura 2.17) [150, 151]. Se estima que en torno al 25% de las especies de microalgas podrían ser auxotróficas para la tiamina y el 8% para la biotina [146]. Estas sustancias producidas por las bacterias estimulan el crecimiento de las microalgas. En este sentido, Croft *et al.* [152] determinaron que el 52% de las especies de microalgas estudiadas eran auxotróficas para la vitamina B12. Kazamia *et al.* demostraron que la especie *Rhizobium loti* aporta vitamina B12 a las microalgas [151], favoreciendo así su desarrollo.

En sentido inverso, las microalgas pueden ser beneficiosas para el desarrollo bacteriano, suministrando un espacio físico en el cuál las bacterias pueden protegerse de ambientes adversos y liberar compuestos orgánicos que facilitan su crecimiento [153].

Profundizar en el estudio de la ecología de los consorcios microalgas-bacterias permite conocer y optimizar las interacciones entre ellas (competencia, depredación, mutualismo, antagonismo, etc.) a lo largo del proceso de depuración de las aguas residuales. De esta manera, mediante el control de las condiciones de operación sería posible mejorar el equilibrio poblacional entre bacterias y microalgas y mantener la estabilidad de los consorcios a lo largo del proceso de depuración. Esto redundará en una mejor eliminación de los compuestos contaminantes, reciclaje de nutrientes y mitigación de emisión de GEI en el tratamiento de aguas residuales [143, 153].

Eliminación de nutrientes

En los últimos años se han realizado estudios a escala de laboratorio empleando sistemas microalgas-bacterias para la depuración de aguas residuales [153, 154]. Muchos de estos trabajos emplean cepas puras de microalgas para tratar agua sintética o agua residual filtrada (estéril), excluyendo a las especies de microorganismos que se desarrollan de manera natural en las aguas [153, 155]. Otra característica general de los trabajos publicados, es la dificultad de comparar los resultados y reproducir los experimentos. La gran variabilidad en la composición de los influentes, y de la heterogeneidad de los consorcios de microalgas, cianobacterias y bacterias utilizados en los distintos estudios hace muy difícil establecer comparaciones. Además, muchos trabajos a escala de laboratorio, emplean condiciones de cultivo, que, en muchas

ocasiones, suelen estar muy alejadas de las condiciones de operación de las plantas piloto o industriales. Variables como la duración de los fotoperíodos, la intensidad lumínica, el uso de la aireación como método de agitación o la inyección de CO₂ como fuente extra de carbono tienen gran importancia en el desarrollo del cultivo. Estos parámetros modifican el pH, la concentración de OD y las especies químicas en las que se pueden encontrar los nutrientes en el medio. Todos estos factores pueden afectar a la composición de las poblaciones microbianas, y por tanto, al rendimiento biológico de los FBRs.

Por ejemplo, Liang *et al.* [156] utilizaron consorcios artificiales formados por el alga *Chlorella vulgaris* y la especie bacteriana *Bacillus licheniformis* para la eliminación de fósforo y amonio. Los cultivos mixtos incrementaron la eliminación de amonio en un 91% en comparación al control bacteriano. Análogamente, la eliminación de nitrógeno y fosforo mejoró un 63 y 23% respectivamente frente al control de microalgas. De esta manera, los autores demostraron la eficacia de estos sistemas mixtos sobre los cultivos puros en la eliminación de nutrientes. En otro trabajo realizado por Mujtaba *et al.* [157], utilizando un agua residual sintética y un consorcio artificial formado por *C. vulgaris* y *Pseudomonas putida*, observaron que en los cultivos mixtos la eliminación del amonio resultó ser un 72% mayor frente al control bacteriano y un 15% mayor frente al control de microalgas. Al analizar la evolución del fosfato, en el control bacteriano no se detectó eliminación, mientras que en el control algal y en el resto de cultivos donde estaba presente el alga se alcanzaron eliminaciones en torno al 60-66% [157]. Los resultados alcanzados por Liang *et al.* y Mujtaba *et al.* empleando consorcios artificiales de microalgas-bacterias son una clara demostración de la eficacia de estos sistemas mixtos frente a los formados únicamente por microalgas o bacterias.

También se han documentado estudios que emplean como inóculo bacteriano los microorganismos presentes en los fangos activos y las aguas residuales [158-161]. Wang *et al.* hallaron porcentajes de eliminación del 87,3% de DQO (materia orgánica), 99,2% de amonio y 83,9% fosfatos utilizando la especie de microalga *C. sorokiniana* y las bacterias del fango activo [161]. Hernández *et al.* estudiaron la eliminación de nutrientes de los purines de cerdo y del agua residual industrial empleando como inóculo la especie *C. sorokiniana*. Utilizando los purines de cerdo como medio de cultivo, obtuvieron porcentajes de eliminación de DQO, amonio y fosfatos de 62,3, 82,7 y 58,0%, respectivamente. Mientras que para el agua industrial, encontraron valores de eliminación del 84,8% de DQO, 100% para el amonio y 80,7% para los fosfatos demostrando la aplicabilidad de los consorcios microalgas bacterias en el tratamiento de aguas [158]. En el mismo sentido, He *et al.* [160] obtuvieron eliminaciones prácticamente totales de amonio y fosfatos (97% y 98%, respectivamente) utilizando un inóculo formado por

C. vulgaris y las bacterias endémicas del agua residual. Todas estas investigaciones demuestran que la incorporación de fango activo como inóculo bacteriano en los consorcios microalgas-bacterias supone un gran potencial para la biorremediación de aguas residuales.

Uno de los inconvenientes de los sistemas basados en los consorcios microalgas-bacterias son los largos TRH necesarios para la eliminación del N. A pesar de que las microalgas, debido a su elevado contenido en N de su fórmula empírica ($\text{CO}_{0.48}\text{H}_{1.83}\text{N}_{0.11}\text{P}_{0.01}$ [49]), pueden asimilar gran parte del N de las aguas residuales, para su completa eliminación pueden ser necesarios mecanismos de nitrificación-desnitrificación (Apartado 2.2.1, Pág. 18). Como se mencionó previamente, estos mecanismos biológicos de eliminación del N requieren el desarrollo de bacterias nitrificantes que para su óptimo funcionamiento, necesitan TRS largos (superiores a 10 días) [162]. Estos TRS son superiores que los TRH con los que se suelen operar los sistemas a escala piloto (3-10 días), por lo que los procesos de nitrificación y desnitrificación se ven desfavorecidos. Alcántara *et al.* [120] realizaron un estudio a escala de laboratorio para fomentar la eliminación de nitrógeno por desnitrificación en un reactor anóxico acoplado a uno aerobio, basándose en el sistema desarrollado previamente por de Godos *et al.* [163]. Con esta configuración los autores consiguieron eficiencias de eliminación del COT del 86-90% y del NT del 68-79%.

Composición de los consorcios microalgas y bacterias

La falta de información sobre la composición, evolución y relaciones metabólicas que se generan en los consorcios microalgas-bacterias durante el proceso de tratamiento de aguas residuales es uno de los factores que limitan la implementación y distribución de estos sistemas para su uso a escala industrial [101]. Autores como Unnithan *et al.* [154] señalan la importancia de caracterizar las poblaciones de microorganismos y las interacciones entre las microalgas, microorganismos asociados y microorganismos presentes en las aguas residuales. Aunque existen referencias de estudios dedicados a la caracterización cualitativa de microorganismos, tanto de microalgas como bacterias [62, 77, 120, 159, 161, 164, 165], son escasos los estudios cuantitativos, en los que se determinen las especies dominantes, sus interacciones con el resto de miembros del consorcio y sus efectos en el tratamiento de aguas residuales [166].

La identificación de las especies de microalgas que se desarrollan de manera natural en los FBRs empleados para el tratamiento de agua residual es una tarea necesaria para la caracterización de los sistemas y para la comprensión de las dinámicas de depuración. Se ha

demostrado que las variaciones en las poblaciones microbianas tienen impacto en el proceso de eliminación de contaminantes [167]. Según Craggs *et al.* [76] en la depuración de agua residual mediante sistemas *raceway* los consorcios de microalgas suelen estar dominados por los géneros *Scenedesmus*, *Micractinium*, *Pediastrum* y *Actinastrum*. En el trabajo realizado por de Godos *et al.* [62], utilizando purines de cerdo como influente, encontraron individuos pertenecientes a los géneros: *Chlamydomonas*, *Protoderma*, *Microspora*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Achananthes*, *Oocystis*, *Senelastrum* y *Akistrodesmus* detectando cambios en la evolución de las poblaciones a lo largo del proceso de depuración. En este sentido, Assemany *et al.* [77] analizaron el efecto de la radiación solar sobre la evolución de poblaciones de microalgas en *raceways*. En los reactores encontraron 32 géneros distintos de organismos fotosintéticos, siendo *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae* y *Bacillariophyceae* las clases con mayor dominancia. En el estudio de Kim *et al.* [71] se identificaron, mediante observación microscópica, los géneros *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., y *Stigeoclonium* sp., mientras que con la técnica DGGE solo consiguieron detectar *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., los autores justificaron estos resultados debido a la limitación de los *primers* seleccionados para la amplificación del gen 18S [71].

Los estudios publicados sobre la identificación de las poblaciones bacterianas emplean, metodologías muy distintas. Ferrero *et al.* [165], en cultivos de microalgas crecidas sobre purín de cerdo, identificaron especies pertenecientes a los filos *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, γ -*Proteobacteria*, *Deinococcus-Thermus* y *Chlamydiae* empleando la técnica DGGE. En un trabajo previo de Alcántara *et al.* [120] se estudió el cambio en las poblaciones bacterianas durante el proceso de depuración. En el inóculo se identificaron filos propios del fango activo como *Actinobacteria*, *Chlamydiae* y *Firmicutes*. A lo largo del proceso de depuración se identificaron especies desnitrificantes como *Simplicispira* y *Thauera* y también bacterias pertenecientes al grupo de Rhizobacterias.

Lakaniemi *et al.* [164] efectuaron un estudio para caracterizar las bacterias que se desarrollan junto a la especie de microalga *C. vulgaris* cultivada en un medio sintético. En los análisis de la DGGE observaron 24 secuencias correspondientes a bacterias. El género más abundante en todas las muestras fue *Sphingomonas*, miembro del Filo α -*Proteobacteria*, por lo que se concluyó que este género de bacterias tiene afinidad para desarrollarse junto a la especie *C. vulgaris* [164].

Fulbright *et al.* [166] caracterizaron las poblaciones bacterianas que se desarrollan en los cultivos de *Nannochloropsis salina* en medio sintético empleando técnicas de análisis masivo de ADN. En este trabajo, los autores encontraron que en torno al 90% de las bacterias presentes en

las muestras pertenecían a los Filos *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. Otros órdenes menos abundantes fueron *Chytophagales*, *Sphingobacteriales*, *Flavobacteriales* y *Rhizobiales* [166].

En el estudio previamente mencionado de Wang *et al.* [161] observaron que ciertas especies presentes en el fango activo disminuyen su presencia cuando está presente la microalga *Chlorella sorokiniana*. Estas especies bacterianas consistieron en: *Fluviicola taffensis*, *Pseudomonas panipatensis*, *Bacillus persicus*, *Sphingopyxis terrae*, y *Citrobacter freundii*. En cambio, especies como *Pseudomonas putida* y *Flavobacterium hauense* aumentan su presencia cuando *C. sorokiniana* forma parte del consorcio. Su *et al.* [159], también mediante DGGE, identificaron grupos bacterianos presentes en sus cultivos mixtos (microalgas-fango activo) de agua residual. En ellos identificaron 8 bandas de las que 2 correspondían a bacterias del Filo α -*Proteobacteria*, 2 a especies del grupo *Flavobacteria*, 1 a γ -*Proteobacteria*, 1 a β -*Proteobacteria* y 1 al género *Sphingobacteria*.

De todos estos trabajos puede concluirse que los grupos de bacterias encontrados en el tratamiento de aguas residuales empleando microorganismos fotosintéticos se diferencian de los mayoritarios en los tratamientos con fangos activos, generalmente caracterizados por ser microorganismos microaerobios o aerotolerantes pertenecientes a los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* y *Chloroflexi* [168]. Esta diferencia en los taxones bacterianos encontrados en los fangos activos frente a los encontrados en los tratamientos en los que están presentes las microalgas, demuestran la existencia de fenómenos que afectan al desarrollo poblacional.

2.4. Aprovechamiento de la biomasa microalga-bacteria

La biomasa de microalgas y bacterias obtenidas en el proceso de depuración de aguas residuales puede ser revalorizada mediante la producción de biocombustibles y bioproductos, lo que puede contribuir a hacer que estos sistemas mixtos de tratamiento de aguas sean más rentables. La utilización de aguas residuales como medio para el crecimiento de las microalgas restringe su uso para fines de consumo humano y animal y las incapacita por motivos higiénicos para algunas aplicaciones. Como consecuencia de esto, los productos que se pueden obtener de la biomasa tras el tratamiento de aguas residuales se destinan preferentemente al mercado bioenergético en forma de biocombustibles. Los principales biocombustibles que se pueden desarrollar a partir de la biomasa microalgal son el biodiesel, bioetanol y biogás.

2.4.1. Biodiesel

Debido al elevado contenido en lípidos que las microalgas pueden llegar a acumular (20-70%) [75], estos microorganismos han sido una atractiva fuente de biomasa para la producción de biodiesel [169, 170]. Un trabajo muy popular publicado en 2007, señaló que las microalgas podían producir entre 3 y 10 veces más biodiesel que los cultivos energéticos tradicionales destinados a este fin [51]. A pesar del gran contenido en lípidos que pueden llegar a producir, la dicha acumulación en las microalgas solo se produce cuando son cultivadas bajo condiciones de estrés, normalmente inducidas por limitación de algún nutriente esencial como N o Si [171]. En estas situaciones de cultivo las tasas de crecimiento de las microalgas están muy afectadas, resultando en una baja productividad neta de triglicéridos. En el contexto del tratamiento de aguas residuales, la proporción de lípidos presente en la biomasa no suele superar el 20-25% [94, 95, 172]. Además de la baja producción, hay que añadir los costes de extracción de los triglicéridos y su transformación en biodiesel mediante el proceso de transesterificación. Además, se ha demostrado que un alto porcentaje de los lípidos contenidos en la biomasa de microalgas corresponde a lípidos polares no transesterificables y que por lo tanto, no pueden ser convertidos en biodiesel [173].

Los análisis de ciclo de vida para la producción de biodiesel a partir de microalgas revelan que es un proceso energéticamente desequilibrado y poco favorable [174]. Es por ello, que a pesar de la gran labor investigadora realizada durante la pasada década, hoy en día se considera que el cultivo de microalgas, principalmente utilizando aguas residuales, no es una alternativa viable de producción de triglicéridos para su posterior transformación en biodiesel.

2.4.2. Bioetanol

Para la producción de etanol, las biomoléculas que se emplean como sustrato son los azúcares, principalmente los azúcares sencillos, hexosas y pentosas. Las microalgas son microorganismos que en su biomasa puede llegar a acumular grandes cantidades de azúcares (hasta el 37-55%), por lo que pueden ser buenas candidatas para dicha producción [175]. El uso de microalgas como fuente de producción de etanol requiere como paso indispensable la hidrólisis de los azúcares complejos a azúcares más simples y fermentables mediante procesos físicos, químicos o biológicos [175-178]. Una vez realizada la hidrólisis se realiza la fermentación alcohólica mediante el empleo de levaduras o bacterias [179].

Las limitaciones de las microalgas como materia prima para la producción de bioetanol radican fundamentalmente en la composición de hexosas de sus carbohidratos, puesto que las levaduras fermentan preferentemente azúcares de seis átomos de carbono (como la glucosa). Una parte de los azúcares de las microalgas están compuestos por ácidos urónicos y aminoazúcares que no son fermentables por las levaduras convencionales [180].

2.4.3. Biogás: biometano

El biogás se produce a partir de la descomposición anaerobia de biomasa. La producción de biogás se realiza en el proceso llamado digestión anaerobia. Comienza con la acción de las bacterias hidrolíticas que van a descomponer los componentes macromoleculares (lípidos, proteínas y azúcares) de la biomasa en moléculas más simples. A continuación, los microorganismos acidogénicos actúan en la conversión de las moléculas simples en ácidos grasos (acetato, propionato, butirato entre otros) que, posteriormente, en el proceso de acetogénesis son convertidos a moléculas de acetato. El acetato es el principal sustrato empleado por las arqueas metanogénicas para la producción de metano y dióxido de carbono [181].

A diferencia del biodiesel y el bioetanol, el biogás se produce a partir de las tres fracciones macromoleculares de la biomasa, lo que supone una ventaja en la transformación de las microalgas en biocombustibles.

Debido a la gran cantidad de fangos que se generan durante el tratamiento de agua residual urbana, la gestión de los mismos puede conllevar costes económicos suplementarios. Por norma general los fangos deben ser deshidratados debido a su alto contenido en agua (90%) para poder ser eliminados en vertederos especiales, incinerados, y en los casos donde es posible ser destinados como enmiendas agrícolas [182]. Una de las salidas más empleadas es la revalorización de estos lodos a través de la digestión anaerobia para la producción de biogás (45-65% metano), en el proceso denominado línea de fangos [13]. Utilizando el fango activo como sustrato se pueden obtener rendimientos de producción de metano de entre 0,14-0,22 L CH₄ g SV⁻¹_{iniciales} [183].

En el campo del tratamiento de aguas con microalgas, los fangos fotosintéticos también pueden ser revalorizados empleando la misma tecnología de digestión anaerobia que la utilizada en las plantas de tratamiento convencionales. A través de la digestión anaerobia de la biomasa

de microalgas se pueden conseguir rendimientos de metano de entre 0,15 y 0,40 L CH₄ g SV¹ _{iniciales} superiores a los encontrados para el fango activo de las EDAR [184-187].

La mayoría de los grupos de microalgas presentan una rígida pared celular que dificulta la accesibilidad a los compuestos de la biomasa algal. Esta barrera supone un problema al ataque de los microorganismos metanogénicos en el proceso de digestión anaerobia [184]. La pared celular protege a las microalgas de los ataques de las bacterias hidrolíticas. Para reducir esta recalcitrancia es necesaria la aplicación de pretratamientos físicos, químicos y biológicos previos al proceso de digestión anaerobia. Estos pretratamientos rompen la pared celular y facilitan el acceso de los microorganismos al interior de las microalgas [188-190]. Dependiendo de la agresividad del pretratamiento empleado es posible conseguir mejoras en los rendimientos de producción de metano. Por ejemplo, a través del pretratamiento térmico, empleando temperaturas de entre 50-80°C es posible obtener mejoras del rendimiento de entre 5-20% [87]. En cambio, si la temperatura empleada es de 90-120°C la mejora puede ascender hasta el 50-100% [87]. Cabe mencionar que gracias al calor generado en la combustión del biometano obtenido en la digestión anaerobia, éste puede ser aprovechado como fuente de energía para el pretratamiento térmico de la propia biomasa algal. Por este motivo, los sistemas de pretratamiento térmico pueden ser más fácilmente implementados en las plantas de tratamiento.

Otra limitación de la digestión anaerobia de microalgas es la posible inhibición de la metanogénesis debido a un exceso de amonio/amoniaco dentro del digester. Esta inhibición se produce como consecuencia del elevado contenido en proteínas que presenta la biomasa de microalgas [191]. Una estrategia para solucionar esta limitación es emplear junto con las microalgas co-sustratos con un mayor componente en C que incremente la proporción C/N o utilizar inóculos (fango anaerobio) adaptados a altas concentraciones de N [191-193].

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Tratamiento de aguas residuales con consorcios microalgas-bacterias

3.1.1. Microorganismos

Microalgas

Las microalgas empleadas en los ensayos en *batch* (Apartado 4.1, Pág. 89) y en los realizados en semi-continuo cerrados (TRH de 6 días, Apartado 4.2.1, Pág. 96) fueron inoculados con una mezcla homogénea (1:1) de las algas *Chlorella vulgaris* (cepa 211-11) y *Scenedesmus obliquus* (cepa 276-6) obtenidas de la colección de cultivos del banco SAG de la Universidad de Göttingen (Alemania). Debido al uso de aguas residuales sin esterilizar no se garantizaron condiciones axénicas, pudiendo desarrollarse microalgas endémicas de los propios influentes. Tanto las aguas residuales como los fangos activos empleados pueden contener microalgas endémicas que en cultivos fotótrofos pueden desarrollarse conjuntamente con las microalgas inoculadas [109, 159]. Los cultivos se operaron de manera cerrada al ambiente para evitar la evaporación y la contaminación con otros microorganismos presentes en el laboratorio. Posteriormente en los ensayos realizados en semi-continuo con TRH de 3 días (Apartados 4.2.2 y 4.5, Pág. 102 y. 135, respectivamente) se empleó como inóculo de microalgas una cepa aislada del decantador primario de la EDAR de Castellón de La Plana (Comunidad Valenciana, España), durante el mes de abril de 2016, identificada como *Chlorella sorokiniana* (Figura 3.1).

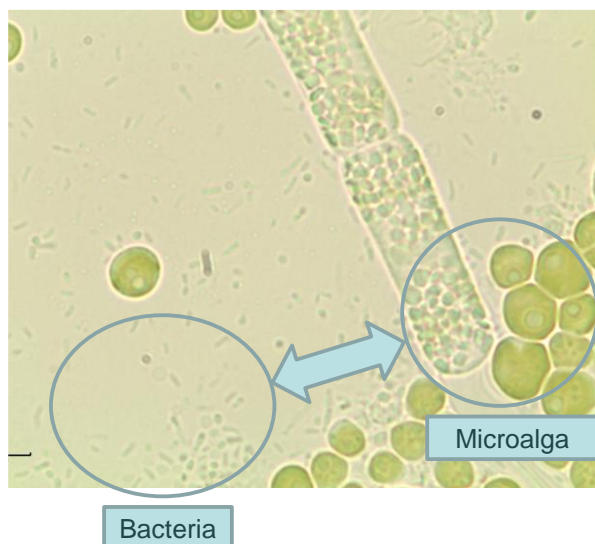


Figura 3.1. Ejemplo del consorcio microalgas-bacterias.

Bacterias: fango activo

Como inóculo bacteriano se empleó fango activo procedente de la EDAR de Castellón de la Plana. Esta EDAR carece de sistemas de eliminación de nitrógeno basado en la nitrificación-desnitrificación, y para la eliminación del fósforo se emplean cationes metálicos para su precipitación. El TRH y el TRS (valores medios) de la EDAR son de 5,8 horas y 6,8 días, respectivamente. El primer lote de fango activo fue recolectado en marzo de 2016 y empleado en los ensayos en *batch* (Apartado 4.1, Pág. 89) y en los ensayos en semi-continuo cerrados (TRH de 6 y 3 días, Apartado 4.2, Pág. 96). El primer lote de fango activo fue almacenado durante el período comprendido entre marzo y junio de 2016. Posteriormente, se recogió un segundo lote en enero de 2017, el cual fue empleado en la repetición de la operación con TRH de 3 d (Apartado 4.5, Pág. 135). Ambos lotes fueron almacenados a 5°C y antes de su uso fueron incubados durante 24 horas a temperatura ambiente y con aireación, con la finalidad de aclimatar los microorganismos del fango activo.

3.1.2. Cultivo del Inóculo

Los inóculos de las microalgas fueron cultivados en matraces Erlenmeyer de 1 L con un volumen de trabajo de 0,75 L, cerrados del ambiente con tapones de algodón, iluminados constantemente por luz artificial a través de tubos fluorescentes localizados a ambos lados de los matraces con una intensidad lumínica de $100\text{--}120\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ en la superficie de los

matraces. Este valor fue determinado con un espectro-radiómetro, Blue-Wave, StellarNetInc, (EEUU). El medio de cultivo utilizado fue Bold basal modificado con respecto a la receta original [194]. La composición química de las soluciones y las cantidades requeridas de cada una para preparar 1 L de cultivo se muestran en la Tabla 3.1. Como fuente de N se sustituyó el NaNO_3 por NH_4Cl y se añadió tris-acetato como fuente de carbono. Todos los componentes fueron preparados en soluciones independientes y autoclavadas a 120°C durante 20 minutos.

Tabla 3.1. Soluciones stock para preparar el medio de cultivo Bold basal modificado.

Solución stock	Nombre	Fórmula	Concentración en el stock (g L ⁻¹)	Volumen empleado (mL)	Concentración final (mg L ⁻¹)
1	Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	8	10	80
2	Cloruro cálcico dihidrato	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5	10	25
3	Sulfato de magnesio heptahidrato	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5	10	75
4	Fosfato potásico dibásico	K ₂ HPO ₄	7,5	10	75
5	Fosfato potásico dihidrógeno	KH ₂ PO ₄	17,5	10	175
6	Cloruro sódico	NaCl	2,5	10	25
7	Solución EDTA alcalina				
	EDTA disódico	Na ₂ EDTA	50	1	50
	Hidróxido potásico	KOH	31		31
8	Solución de hierro ácida				
	Sulfato de hierro (II) heptahidrato	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5	1	5
	Ácido sulfúrico (99%)	H ₂ SO ₄	1 (mL L ⁻¹)		1 (μL L ⁻¹)
9	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11,4	1	11,4
10	Solución de metales traza				
	Sulfato de zinc heptahidrato	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,8		17,6
	Cloruro de magnesio (II) tetrahidrato	MgCl ₂ ·4H ₂ O	1,4	5	2,8
	Trióxido de molibdeno	MoO ₃	0,7		1,4
	Sulfato de cobre (II) pentahidrato	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,6		3,2
	Nitrato de cobalto hexahidrato	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,5		1
11	Solución de Tris-acetato				
	Tris-(hidroximetil) aminometano	(HOCH ₂) ₃ CNH ₂	242	10	2420
	Ácido acético	CH ₃ COOH	100 (mL L ⁻¹)		1 (mL L ⁻¹)

3.1.3. Sistemas de tratamiento de agua

Agua residual urbana

Las aguas se recogieron en ambos casos después del desbaste y sedimentación primaria (tratamiento primario). La composición del agua varió en función de la procedencia, del día de muestreo y de la estación del año, y fueron clasificadas en 4 lotes en función de los experimentos que se realizaron con ellas. La composición de cada lote se detalla en la Tabla 3.2. Los lotes 1 y 2 procedieron de la EDAR de Castellón de La Plana (Valencia), mientras que los lotes 3 y 4 se recolectaron en la EDAR piloto de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC, Madrid). Los lotes 1, 2 y 4 se congelaron en botellas de 10 L para garantizar la homogeneidad en la composición durante el período de experimentación.

Tabla 3.2. Composición de las aguas residuales empleadas como influentes

Parámetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Procedencia	EDAR Castellón	EDAR Castellón	Piloto URJC	Piloto URJC
DQO_s	132,3 ± 2,6	240,0 ± 5,3	290,2 ± 123,0	226,0 ± 27,7
DQO_T	201,8 ± 17,7	440,0 ± 7,7	498,6 ± 190,0	458,8 ± 25,2
N-NH₄⁺	60,6 ± 1,9	60,25 ± 2,3	34,1 ± 16,3	49,2 ± 3,6
N-NO₂⁻	0,0 ± 0,0	1,32 ± 0,1	0,9 ± 0,8	0,0 ± 0,1
N-NO₃⁻	1,9 ± 0,0	1,66 ± 0,0	1,2 ± 1,1	0,1 ± 0,0
P-PO₄³⁻	15,7 ± 3,8	13,1 ± 1,7	4,9 ± 3,6	3,1 ± 0,4
SST	130 ± 0	170 ± 40	170 ± 60	140 ± 10
SSV	80 ± 10	90 ± 20	150 ± 40	90 ± 10
pH	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,0	7,1 ± 0,1
CI*	-	108 ± 0,1	46,0 ± 5,6	73,3 ± 2,2

*CI: Carbono inorgánico

El almacenamiento de las aguas residuales a 5°C no evita la lenta degradación de la materia orgánica, por lo que este método imposibilita mantener las condiciones iniciales de los influentes durante largos períodos. El lote 3 se recogió de manera periódica para mantener las características físico-químicas de los influentes lo más similares posibles a las aguas de entrada del sistema de depuración. A pesar de que la recolección del agua residual fresca dificulta la comparación con el resto de ensayos, también permite valorar la capacidad de depuración del sistema en condiciones más realistas que inevitablemente llevan asociadas las variaciones típicas de EDAR. Más concretamente, las desviaciones en la composición de los influentes son

debidas principalmente a las variaciones del régimen de precipitaciones que afectaron a la EDAR Piloto de la URJC.

Test de biodegradabilidad

Con la finalidad de determinar la fracción biodegradable y no biodegradable de las aguas residuales urbanas de los lotes 3 y 4 (Pág. 106 y 138, respectivamente), se empleó el protocolo modificado de Park *et al.* [195]. El test consistió en un reactor de 1 L que contenía agua residual y que fue inoculado con fango activo del lote correspondiente a cada ensayo con una concentración inicial de $1,0 \pm 0,2$ g SSV L⁻¹, agitado a 250 rpm, con aireación a través de una bomba aireadora y con una temperatura controlada de 24°C. Se obtuvieron alícuotas del reactor periódicamente para la determinación de la DQO. Siguiendo la metodología indicada por Park *et al.* [195], se calcularon las fracciones de DQO biodegradable y no biodegradable.

Sistemas de tratamiento

Discontinuo (*Batch*)

Los sistemas de tratamiento en *batch* consistieron en FBRs de volumen de trabajo de 1 L, agitados magnéticamente (250 rpm, D-91126, Heidolph, Alemania) e iluminados mediante lámparas fluorescentes (18W, Sylvania, Alemania), resultando en una intensidad lumínica de 122 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie del reactor con ciclos diarios de luz /oscuridad de 14 y 10 horas, respectivamente. Los FBRs consistieron en cilindros de cristal de 10 cm de diámetro y 20 cm de altura con un encamisado exterior (Figura 3.2), conectados a un sistema de control de temperatura (F12, Julabo, Alemania) para mantener la temperatura constante a 24°C.

Con estos ensayos operados en *batch* se experimentaron distintas relaciones de inoculación microalga/bacteria para determinar la proporción óptima para el tratamiento de aguas. Las diferentes proporciones de microorganismos se inocularon con una concentración inicial en los FBRs de $0,4 \pm 0,1$ g SSV L⁻¹. Con cada tipo de inóculo se realizaron cultivos por duplicado utilizando diferentes porcentajes de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*) y bacterias (fango activo) de la siguiente manera: A) 100-0%, B) 75-25%, C) 50-50%, D) 25-75% y E) 0-100% respectivamente. Los cultivos se operaron sin aireación, el OD presente en los FBRs fue el producido exclusivamente por la actividad fotosintética.



Figura 3.2. Cultivos de microalgas-bacterias en FBRs de 1 L empleados para el tratamiento de aguas residuales urbanas.

Semi-continuo

Al igual que los experimentos en *batch*, los FBRs de 1 L se realizaron por duplicado y fueron operados sin contacto con la atmósfera exterior y con el mismo equipo de iluminación y agitación. Estas condiciones permiten estudiar la actividad biológica de los consorcios mediante el cálculo de balances de materia (para el oxígeno y nitrógeno). Los FBRs empleados para los ensayos con régimen de alimentación semi-continuo fueron diseñados con dos TRH. Más concretamente, se emplearon de 6 y 3 días (d) para el estudio de las dinámicas de depuración. Las muestras fueron obtenidas directamente del cultivo de manera periódica. Los sistemas de alimentación/sustracción del medio de los FBRs fueron automatizados mediante bombas peristálticas (MiniPlus Evolution, Gilson, EEUU) y programadores de corriente para activar las bombas en el horario preestablecido. La sustracción y adición del medio fue secuencial y la duración fue, para ambos procesos, de 10 minutos.

Con el TRH de 3 días se realizaron dos experimentos, el primero fue inoculado con fango activo del lote 1. En éste, además de la caracterización de los parámetros de depuración se realizó una caracterización más completa del proceso incluyendo (Figura 3.3): I) la determinación de las dinámicas de poblaciones, tanto de microalgas como de bacterias mediante técnicas moleculares cualitativas (DGGE) y cuantitativas de citometría de flujo, y II) una monitorización y modelización de las variaciones de la concentración de oxígeno disuelto (OD) durante el proceso, para explicar los procesos metabólicos que ocurren durante la depuración de aguas residuales.

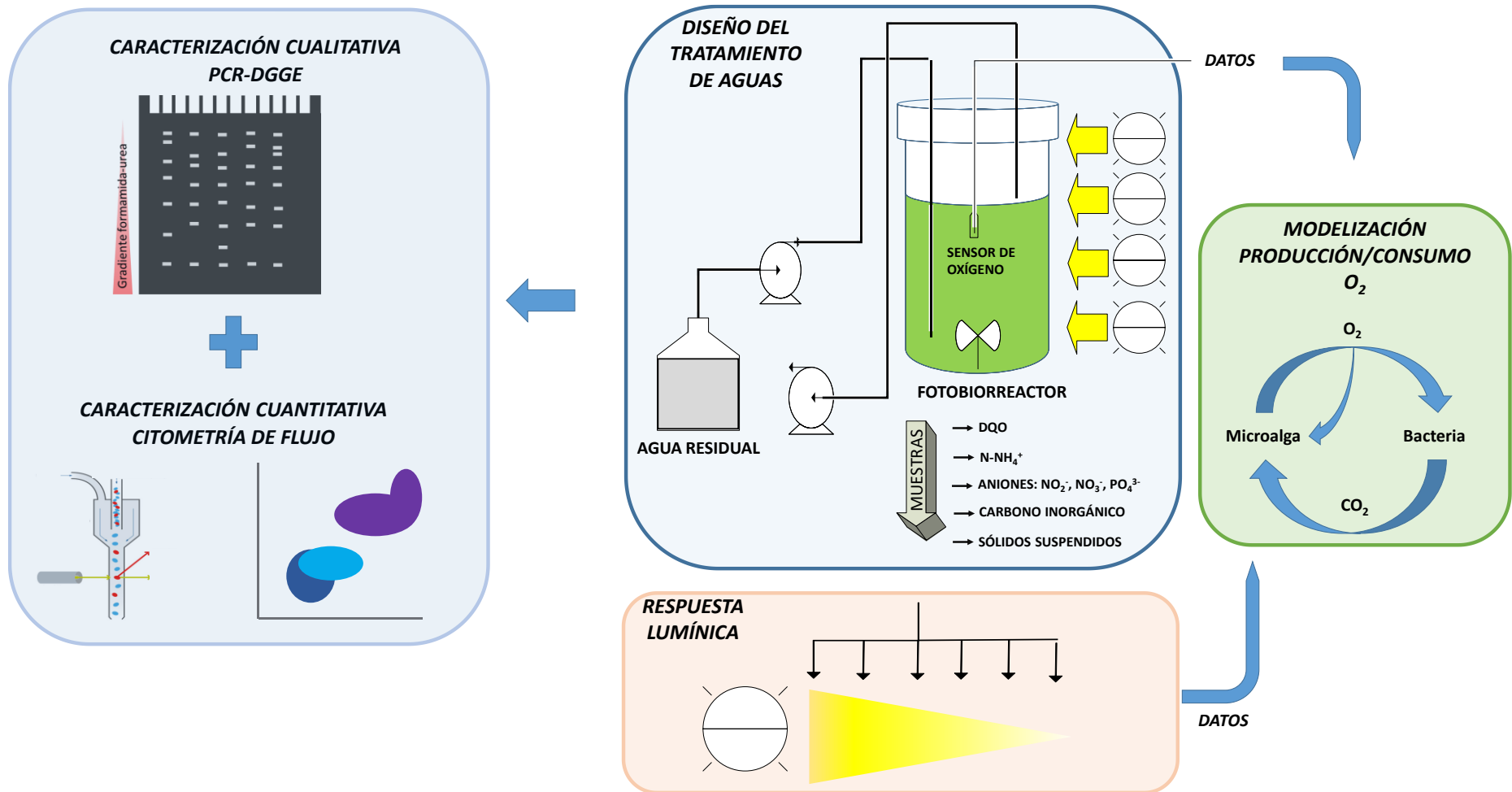


Figura 3.3. Resumen de ensayos realizados para la caracterización de la simbiosis microbiana y su funcionamiento en el modo de operación semi-continuo (TRH 3 d).

En el último ensayo operado con TRH 3 d los duplicados (FBR A y B) fueron inoculados con fango activo del lote 2. Además del estudio de la eliminación de materia orgánica y nutrientes se realizó una caracterización exhaustiva de las poblaciones del consorcio a través del análisis masivo de ADN con la plataforma Illumina MiSeq. La operación en este ensayo se dividió en dos períodos. El primer período de operación fue cerrado al ambiente (Fase 1, 42 días) y en el segundo se procedió a destapar el reactor B (Fase 2, 12 días). De esta forma se evaluó el posible impacto negativo de la sobresaturación de compuestos volátiles (NH_3 y O_2) sobre el proceso de depuración y sobre la composición del consorcio. Durante la Fase 1, la alimentación del agua residual ocurrió durante el período de iluminación del ciclo. Posteriormente, en la Fase 2, en ambos duplicados la alimentación de agua residual ocurrió durante el período de oscuridad. El cambio de hora de la alimentación fue implementado con la intención de generar las condiciones de anoxia nocturna necesarias para la desnitrificación. Se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo de temperatura, fotoperíodo, intensidad lumínica y el sistema de adición/sustracción que en los anteriores experimentos.

3.1.4. Métodos analíticos

Sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV)

El contenido en células y sólidos de las aguas residuales se realizó mediante la determinación de los sólidos suspensión totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV), medidos mediante los protocolos normalizados (*Standard Methods*) [196]. Los valores de los SST y las SSV se obtuvieron filtrando un volumen determinado de muestra a través de un filtro de fibra de vidrio de tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ (Merk). Los SST se obtuvieron pesando el filtro después de 3 horas en una estufa a 105°C y los SSV se calcularon a partir del peso de las cenizas presentes en el filtro después de calcinar la muestra a 550°C durante 30 minutos.

Demanda química de oxígeno total (DQO_T) y soluble (DQO_S)

La materia orgánica presente en las muestras fue cuantificada de manera indirecta a través de la demanda química de oxígeno (DQO). Para ello se empleó el kit comercial (Merck, ISO 15705) basado en la colorimetría de la oxidación de materia orgánica con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Este viraje de color fue cuantificado empleando un espectrofotómetro (Spectroquant®Pharo 100, EU) para

determinar la fracción total (DQO_T). La DQO_5 fue obtenida después de centrifugar las muestras a 5.000 rpm durante 15 minutos (Haraeus Megafuge 16R, Thermofisher, Alemania) y posteriormente filtrada a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μm (VWR, EEUU).

Cuantificación de aniones: NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-}

Las alícuotas de las muestras se separaron de los sólidos mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se filtraron 2 mL de muestra utilizando filtros de jeringa de nylon de 0,25 μm de diámetro y 0,22 μm de tamaño de poro (VWR, EEUU). Se determinó la concentración de iones NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-} mediante un cromatógrafo de líquidos iónico Compact IC Flex 930 (Metrohm, Suiza), constituido por un detector de conductividad y acoplado a un supresor químico para eliminar iones interferentes presentes en el medio analizado. Se utilizó una columna Metrosep A Supp5-250/4.0 (Metrohm, Suiza) específica para la separación de aniones, y una disolución reguladora 3,2 mM Na_2CO_3 /1,0 mM NaHCO_3 como fase móvil. El flujo de trabajo fue de 0,7 mL min^{-1} , y el volumen de muestra inyectado en la columna fue de 5 μL .

Nitrógeno Kjeldahl total (NKT), nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+) y nitrógeno total (NT)

La medida de NKT se utilizó para determinar la cantidad de N presente en la muestra, exceptuando NO_2^- y NO_3^- [197]. Este método incluye una digestión, destilación y valoración. La muestra fue digerida (Bloc-Digest Macro, Selecta, España) añadiendo 12 mL de ácido sulfúrico (95%) junto con un catalizador comercial (K_2SO_4 y CuSO_4) durante 1 hora a 420°C. Posteriormente a la digestión, la muestra fue destilada (Pro-Nitro M, Selecta, España) con la finalidad de recoger en un matraz el N presente en la muestra. La muestra en la destilación fue neutralizada con 50 mL de NaOH (40%) para convertir el N-NH_4^+ procedente de los componentes orgánicos en N-NH_3 , que fue volatilizado con vapor de agua y precipitado sobre una solución receptora (25 mL) de ácido bórico al 4% y con verde bromocresol y rojo de metilo como indicadores de pH. Por último, se realizó la valoración usando un dispensador (Vitlab) con ácido clorhídrico 0,05 N. El contenido en N de la muestra fue calculado acorde a la Ecuación 3.1:

$$\text{Nitrógeno } \% = \frac{(T - B) \cdot N \cdot 14,007 \cdot 100}{P}$$

Ecuación 3.1. Fórmula empleada para determinar el porcentaje de nitrógeno de las muestras biológicas.

Dónde T es el volumen de ácido necesario para la valoración de la muestra, B es el volumen de ácido requerido para la valoración del blanco, N es la normalidad del ácido clorhídrico (14,007 – masa molar del nitrógeno, mg mmol^{-1}) y P se corresponde con el peso o el volumen de la muestra.

Por otro parte, el $\text{N-NH}_3/\text{N-NH}_4^+$ contenido en la fracción soluble fue obtenido centrifugando a 5.000 rpm durante 15 minutos (Haraeus Megafuge 16R, Thermofisher, Alemania) y posteriormente filtrando la fracción a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μm (VWR, EEUU). A continuación, la concentración de $\text{N-NH}_3/\text{N-NH}_4^+$ soluble fue medido por espectrofotometría (Spectroquant®pharo 100, EU) con el kit comercial (Merck, ISO 15705). El nitrógeno total, NT, fue determinado a través de la suma de los valores del $\text{N-NH}_3/\text{N-NH}_4^+$, y los aniones NO_2^- y NO_3^- determinados por cromatografía iónica.

Determinación de los mecanismos de transformación de N y balance de materia

Los mecanismos de transformación del N-NH_4^+ que ocurren durante la depuración son cuatro: volatilización en forma de NH_3 y N_2O , nitrificación y asimilación en forma de biomasa de los consorcios microalgas-bacterias. De los cuatro mecanismos fueron cuantificadas la volatilización en forma de NH_3 , la nitrificación y la asimilación. Para cuantificar el porcentaje de N transformado por cada mecanismo se calculó un balance de materia para cada elemento. La cantidad de N convertido en NO_2^- y NO_3^- , como se mencionó previamente fue medida a través de la cromatografía iónica. El N incorporado a la biomasa fue calculado a través del producto de la concentración de biomasa en términos de SSV multiplicado por el porcentaje de N de la biomasa. El N volatilizado en forma de N-NH_3 fue calculado por sustracción del nitrógeno entrante en el reactor respecto al saliente, de acuerdo con el balance de materia siguiente:

$$N_{volatilizado} = [N_{NH_4^+ inf}] - ([N_{NH_4^+ enf}] + [N_{NO_x}] + [N_{biomasa}])$$

Ecuación 3.2. Determinación de la volatilización del N.

Donde, $N_{NH_4^+ inf}$ representa el flujo másico de nitrógeno amoniacal en el influente, $N_{NH_4^+ enf}$ es el flujo másico de nitrógeno amoniacal en el efluente, N_{NO_x} es el flujo másico de nitritos y nitratos en el efluente y, por último, el $N_{biomasa}$ es el flujo másico presente en forma de biomasa del efluente, obtenido a través de la medición de NKT.

Para determinar las dos formas químicas del nitrógeno amoniacal, NH_3/NH_4^+ , se calculó el reparto de ambos compuestos de acuerdo con el equilibrio químico en las condiciones de pH detectadas en el reactor y corregido con valores de temperatura (T en Kelvin) según la Ecuación 3.3 [198]:

$$NH_3 = NH_4^+ \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0,09018 + \frac{2729,92}{T})}} \right)$$

Ecuación 3.3. Fórmula empleada para la determinación del porcentaje de NH_3 .

Determinación de la concentración de CO_2

La concentración de CO_2 en el reactor y en los influentes se calculó por el método de valoración (4500- CO_2) descrito en los métodos normalizados [196]. La concentración de HCO_3^- , CO_3^{2-} y CO_2 y equivalentes en carbono se estimó a partir del cálculo del valor de la alcalinidad total, T , (Alcalinidad 2320), según la siguiente ecuación:

$$Alcalinidad\ total, mg\ CaCO_3 L^{-1} = \frac{A \cdot N \cdot 50.000}{volumen\ muestra}$$

Ecuación 3.4. Determinación de la alcalinidad equivalente en $CaCO_3$.

Dónde la A es el volumen de ácido necesario para alcanzar el pH 4,3. Para realizar esta medición se empleó el pH-metro (Crison Basic 20+, Italia) calibrado de manera regular con soluciones de pH 4,01, 7,00 y 9,21 (Hanna, HI). La N se corresponde a la normalidad del ácido.

A partir del valor de la alcalinidad total (T) se puede obtener la concentración de bicarbonato, HCO_3^- (a) mediante la siguiente:

$$mg\ HCO_3^- L^{-1} = \frac{T - 5 \cdot 10^{(pH-10)}}{1 + 0,94 \cdot 10^{(pH-10)}}$$

Ecuación 3.5. Determinación de la concentración de HCO_3^- .

La concentración de carbonato, CO_3^{2-} (b), se estima a partir de la concentración de bicarbonato (a) usando la Ecuación 3.6:

$$mg\ CO_3^{2-} L^{-1} = 0,94 \cdot a \cdot 10^{(pH-10)}$$

Ecuación 3.6. Determinación de la concentración de CO_3^{2-} .

La concentración de CO_2 libre en la muestra se obtiene a partir del valor de la concentración de bicarbonato a con la Ecuación 3.7:

$$mg\ CO_2\ libre\ L^{-1} = 2,0 \cdot a \cdot 10^{(10-pH)}$$

Ecuación 3.7. Determinación del CO_2 libre.

Para estimar el valor de la concentración de las formas de carbono en CO_2 total, se emplearon los valores de a , b y c en la Ecuación 3.8. Usando la concentración de CO_2 total se puede calcular la concentración de carbono teniendo en cuenta el peso molecular del CO_2 y el atómico del C.

$$mg\ CO_2\ total\ L^{-1} = c + 0,44(2a + b)$$

Ecuación 3.8. Determinación de la concentración de carbono inorgánico en equivalentes de CO₂.

Caracterización del pH y el Oxígeno disuelto (OD) durante el tratamiento del agua residual

Para monitorizar la evolución del OD y el pH en los FBRs durante el estudio del tratamiento del agua residual se empleó una sonda multiparamétrica (Hanna 9828, EE.UU.). El sensor de pH de la sonda (769828-1, Hanna, HI) fue calibrado de manera regular con soluciones de pH 4,01, 7,00 y 9,21 (Hanna, HI). De la misma manera, el sensor de OD (769828-2, Hanna, HI) fue calibrado de manera regular usando como referencia el valor del 100%, la saturación de oxígeno del aire.

3.2. Modelización de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto (OD)

La evolución de OD durante la depuración de aguas residuales en sistemas en continuo se usó para determinar la actividad biológica del consorcio. Este análisis se hizo durante la operación en sistemas cerrados que evitan el intercambio gaseoso con la atmósfera permitiendo calcular un balance de materia para el oxígeno de acuerdo con la Ecuación 3.9:

$$O_2\ acumulado = O_2\ producido\ por\ microalgas - O_2\ consumido\ por\ bacterias$$

Ecuación 3.9. Balance de acumulación de oxígeno.

3.2.1. Producción de oxígeno por las microalgas

De acuerdo con las ecuaciones presentadas en la Apartado 2.3.4 (Pág. 43), el oxígeno producido por las microalgas es función principalmente de la intensidad de luz. Se usó el modelo descrito por Molina-Grima *et al.* [122], en el que la velocidad de producción de oxígeno, $RO_{2_{pho}}$ depende de la velocidad fotosintética máxima, $RO_{2_{max}}$, característica de la cepa de microalga

empleada, la intensidad lumínica media dentro del FBR, I_{av} , la constante media de saturación para cada cepa, I_k , y el parámetro formal n . Específicamente, $RO_{2_{pho}}$ se calcula mediante la Ecuación 2.2 (Pág. 45).

El modelo presentado por Molina-Grima *et al.* (Ecuación 2.2) fue modificado para considerar la foto-inhibición de la $RO_{2_{pho}}$ a elevadas irradiaciones, incluyendo una constante de inhibición, I_i , usando una expresión muy similar a los modelos de respuesta enzimática descritos por Haldane para la inhibición por sustrato (Ecuación 2.5 Pág. 47) [199]. Para la determinación de los elementos de la Ecuación 2.5 ($RO_{2_{max}}$, I_k , I_i , los parámetros formales n y m) se realizaron determinaciones de velocidades de producción de oxígeno a diferentes niveles de intensidad de luz.

Determinación de la intensidad lumínica media (I_{av}) en el FBR

El valor de I_{av} fue calculado con los datos de la radiación activa fotosintética (PAR por sus siglas en inglés) en la superficie de los FBRs (I_0 , en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a partir de la concentración de biomasa (C_b , en g L^{-1}), el paso de luz en el reactor (diámetro, p) y el coeficiente de extinción lumínica (K_a , igual a $0,15 \text{ mg m}^2 \text{g}^{-1}$). La K_a fue determinada experimentalmente mediante en una regresión de absorbancia respecto a la concentración de biomasa. La fórmula empleada para el cálculo de la I_{av} fue descrita en la Introducción (Ecuación 2.3, Pág. 46).

Caracterización de la respuesta lumínica

Los valores de $RO_{2_{max}}$, I_k , I_i , fueron determinados experimentalmente a través de la curva de respuesta lumínica. Esta curva de respuesta lumínica (a modo de ejemplo, Figura 2.15, Pág. 47) fue obtenida aplicando diferentes intensidades lumínicas a alícuotas de 40 mL de los cultivos de microalgas-bacterias extraídos de los FBRs en semi-continuo. Estas alícuotas fueron introducidas en un nuevo FBR cilíndrico de cristal encamisado de 4 cm de diámetro y 6 cm de altura con un volumen total de 50 mL. A este FBR se le acopló una sonda de OD (Crison OD 5060, España) para recoger los cambios en la concentración del gas disuelto. La temperatura fue fijada a 20°C y la agitación fue suministrada por agitación magnética a 200 rpm. Las diferentes intensidades lumínicas se consiguieron distanciando el FBR de la fuente lumínica (Lum.Floodlight led 150 4000K NG, Osram, Germany) (Figura 3.4). La intensidad incidente en el FBR fue medida

en tres puntos de la superficie del cilindro, para tener en cuenta los posibles gradientes. Los parámetros $RO_{2_{max}}$ y los formales n y m fueron determinados por el método de mínimos cuadrados minimizando la siguiente función objetivo (FO) (Ecuación 3.10):

$$FO(RO_{2_{Max}}) = \min \sum^N (RO_{2_{exp}}(I_{av}) - RO_{2_{mod}}(I_{av}))^2$$

Ecuación 3.10. Determinación para realizar el ajuste de mínimos cuadrados.

Dónde $RO_{2_{exp}}$ son los valores determinados experimentalmente a diferentes intensidades de luz I_{av} , $RO_{2_{mod}}$ serían los valores modelizados según la Ecuación 2.2 y la N el número de intensidades de luz ensayadas.

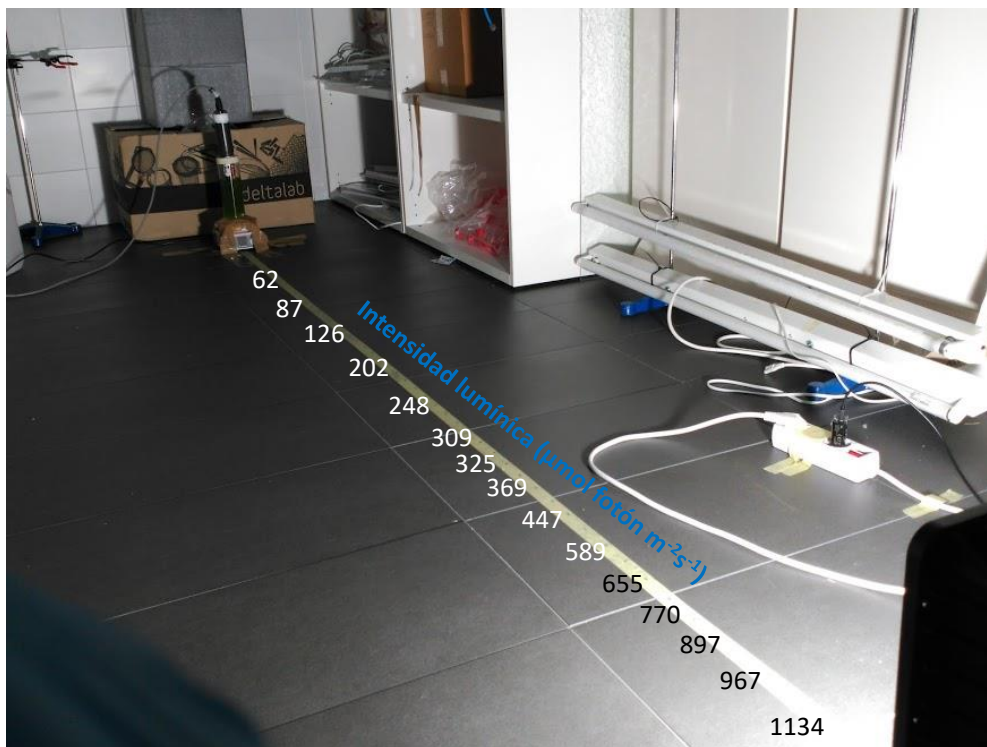


Figura 3.4. Obtención de las diferentes intensidades lumínicas requeridas para la caracterización de la respuesta de producción de oxígeno de los consorcios.

Valoración del efecto inhibitorio del OD en la RO

Debido a las altas concentraciones de oxígeno encontradas en los reactores ($37,1 \pm 0,3$ mg O_2 L^{-1} , Figura 4.24, Pág. 129), se decidió incluir un factor de reducción de las tasas de producción debido al efecto inhibitorio del oxígeno en la modelización. Esta ecuación considera la inhibición por producto (oxígeno) a partir de ciertos valores umbrales que dependerán de la cepa utilizada (Ecuación 2.8, Pág. 50). Esta ecuación ha sido previamente usada en estudios sobre el crecimiento y cultivo de microalgas en ambientes con elevadas concentración de OD [134, 200]. Más concretamente, se considera elevada la concentración al rango de OD comprendido entre 20 y 25 mg O_2 L^{-1} [64].

3.2.2. Consumo de oxígeno bacteriano

La velocidad de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos heterótrofos ($RO_{2_{con}}$) fue modelizada usando las ecuaciones validadas que describen el consumo de oxígeno en los tanques de aireación del tratamiento secundario [13]. La $RO_{2_{con}}$ se calculó utilizando la Ecuación 3.11:

$$RO_{2_{con}} = -R_{US} - 1.42R_{BG}$$

Ecuación 3.11. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno.

Dónde R_{US} representa las tasas de utilización de los sustratos solubles (DQOs), y R_{BG} se corresponde a la velocidad de crecimiento de la biomasa a partir del sustrato disponible multiplicado por un factor estequiométrico (1,42). Estos valores se obtienen de las Ecuación 3.12 y Ecuación 3.13:

$$R_{US}[S, t] = \frac{k \cdot X \cdot S}{(K_s + S)}$$

Ecuación 3.12. Determinación de la velocidad de utilización de sustratos solubles.

$$R_{BG}[S, t] = Y \frac{k \cdot X \cdot S}{(K_s + S)} K_d \cdot X$$

Ecuación 3.13. Determinación de la velocidad de crecimiento de la biomasa heterótrofa.

Dónde k es la velocidad máxima de crecimiento de la biomasa (mg de DQO mg SSV⁻¹ d⁻¹, 12,5 g DQO g SSV⁻¹ d⁻¹), K_s es la cantidad de sustrato en mg L⁻¹ necesario para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de consumo (10 mg DQO L⁻¹), Y es el rendimiento de formación de biomasa (0,40 g SSV g DQO⁻¹ [13]) y S es la concentración de la DQO soluble biodegradable a un tiempo dado (t). La X se corresponde a la cantidad de biomasa aerobia (mg L⁻¹) y se calculó empleando el rendimiento de la formación de biomasa (Y), la eliminación de DQO_s medida en el reactor y el TRH, a través de la Ecuación 3.14.

$$X = Y \frac{(S_o - S)}{1 + k_d \cdot TRH} + Y \cdot \frac{f_d \cdot k_d \cdot (S_o - S) \cdot TRH}{1 + k_d \cdot TRH}$$

Ecuación 3.14. Determinación de la biomasa aerobia

Dónde la k_d es el coeficiente de decaimiento de la biomasa (0,10 g SSV g SSV⁻¹ d⁻¹) y la f_d es la fracción de biomasa decaída (0,15 g SSV g SSV⁻¹) [13].

3.3. Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias

Se emplearon tres técnicas diferentes para la caracterización de los consorcios en términos cualitativos y cuantitativos: DGGE, que permite la identificación hasta nivel de especie; citometría de flujo (CF) que permite identificación y cuantificación de grupos a nivel de características celulares y morfológicas y el análisis masivo de ADN con la plataforma MiSeq de Illumina que permite tanto la identificación como la cuantificación de grupos hasta el nivel de especie, inclusive las más minoritarias (abundancias inferiores al 1%).

3.3.1. DGGE

Tratamiento de las muestras y extracción de ADN

Las muestras tomadas de los FBRs se centrifugaron a 5.000 rpm y el precipitado se lavó con EDTA 0,5% (p/v) para eliminar posibles interferencias de metales en el análisis. Posteriormente se extrajo el ADN del *pool* de microorganismos presentes en la muestra empleando el kit comercial Fast® DNA Spin Kit para suelos (MPBiomedicals, EEUU). A continuación, se analizó la concentración de ADN por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda (Spectrostar Omega, BMG LABTECH, Alemania). El *pool* de secuencias de ADN extraído de las muestras fue amplificado empleando *primers* específicos para los microorganismos eucariotas (microalgas) y procariotas (bacterias).

DGGE Eucariota

La pareja de *primers* seleccionada para la amplificación de las secuencias eucariotas del gen ribosomal 18S, específico para microalgas, fue el Euk1A (5' -CTG GTT GAT CCT GCC AG-3') y el Euk516r (5' -ACC AGA CTT GCC CTC C- 3') con la cola GC (5' -CG CCC GGG GCG CGC CCC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GG- 3'). El diseño de la reacción de la amplificación se modificó sobre la base empleada por Diez *et al.* [201]. La PCR se diseñó para un volumen final de reacción 100 μ L usando la ADN Taq Polimerasa (Roche, Suiza) en una concentración en la reacción de 0,025 U/ μ L. La reacción se realizó añadiendo un tampón de Mg^{2+} (Roche, Suiza). Se añadieron los *primers* hasta alcanzar una concentración final de 0,3 μ M. Los oligonucleótidos (DNTPs) fueron incorporados con una concentración de 2 μ M y la cantidad de ADN que se incluyó en la reacción fue de 100 ng (1 ng μ L⁻¹). Las condiciones del termociclador (Veriti™ 96 Well thermal cycler, Applied Biosystems, EE.UU) consistieron en una desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos, cada uno compuesto por una desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, un *annealing* de 56°C durante 45 segundos y terminado el ciclo con una extensión a 72°C durante 2 minutos. La reacción se concluyó con una extensión final de 72°C durante 5 minutos.

El producto de la amplificación de cada muestra fue cargado en el gel de acrilamida-bisacrilamida (6%) con un gradiente desnaturalizante de formamida-urea 25-50%. La electroforesis en gel desnaturalizante se realizó en una cubeta (BioRad, DCode System, EE.UU) de 5 L de buffer TAE utilizando un voltaje de 60 V durante 16 horas.

PCR-DGGE procariota

La pareja de *primers* bacterianos universales seleccionada para bacterias fue el 338f (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AG-3') con la cola GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') y el 805r (5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'). Los *primers* emparejados tienen como diana la región hipervariable V7 y V8 del gen bacteriano ribosomal 16S [202]. Las bacterias son los principales procariotas responsables de la eliminación de los nutrientes y contaminantes de las aguas, y por lo tanto se emplearon *primers* generalistas para dicho grupo [202, 203]. En el análisis no fueron empleados *primers* para otros tipos de procariotas presentes en los fangos activos, como las arqueas, puesto que estos microorganismos no son los más abundantes ni tienen una especial relevancia en la eliminación de carbono y nitrógeno en los tratamientos de aguas convencionales [204, 205]. Por estos motivos, la mayor parte de los trabajos publicados en el campo de la caracterización microbiana en el tratamiento de aguas se centran en la identificación de bacterias [159, 165, 202, 206, 207].

La PCR fue diseñada para un volumen final de 50 μL empleando la ADN Taq Polimerasa (ROCHE, Suiza) en una concentración en la reacción de 0,05 U μL^{-1} . El resto de componentes se añadieron en las cantidades adecuadas para alcanzar las mismas concentraciones que en la PCR eucariota. Las condiciones del termociclador (Veriti™ 96 Well thermal cycler, Applied Biosystems, EEUU), descritas previamente por Cho *et al.* [208], consistieron en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos; seguida por 35 ciclos cada uno compuesto por una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un *annealing* de 55°C durante 30 segundos y terminado el ciclo con una extensión a 72°C durante 1 minuto. La reacción se concluyó con una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

El producto de la amplificación de cada muestra fue cargado en el gel de acrilamida-bisacrilamida (6%) con un gradiente desnaturalizante de formamida-urea 30-60%. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones que la electroforesis eucariota.

Análisis de secuencias

Los geles obtenidos fueron teñidos durante 30 minutos en una solución de tinción GelRed® (Sigma-Aldrich™, EEUU) y posteriormente se eliminó el exceso de tinte sumergiendo los geles en agua destilada durante 10 minutos. Los geles fueron iluminados con luz UV para ser fotografiados con el sistema de detección MEGA BIO-PRINT-1100/26MX X-Press. Las bandas

detectables se cortaron e incubaron en 50 μ L en agua ultrapura estéril durante 60 minutos a 60°C. Posteriormente, las bandas de cada gel desnaturalizante (DGGE eucariota y procariota) se amplificaron con sus correspondientes *primers* sin la cola GC. En ambos tipos de muestra (procariota y eucariota), el volumen de reacción fue de 50 μ L, manteniéndose constantes las concentraciones de cada reactivo. Las condiciones del termociclador fueron las mismas que las descritas anteriormente para cada tipo de muestra. El sustrato de la reacción de amplificación fue de 5 μ L para eucariotas y 10 μ L para procariotas. La calidad de las amplificaciones se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v usando un marcador de peso molecular de ADN de 80 hasta 10.000 pares de bases (Mass Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, EEUU).

Una vez comprobada la calidad de las secuencias de las PCRs se purificaron usando el kit comercial E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek Inc, EEUU) y cuantificaron por espectrofotometría (Spectrostar Omega, BMG LABTECH, Alemania). La secuenciación fue realizada por el método tipo Sanger y fue llevada a cabo por la empresa Secugen (Secugen S.L., España).

Análisis filogenético

Con el fin de encontrar secuencias similares y especies relacionadas filogenéticamente, las secuencias de los fragmentos amplificados del gen 16S procariota y del 18S procariota fueron comparados. El software empleado fue Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium, Australia) y la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EE.UU) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.3.2. Citometría de flujo (CF)

Las muestras obtenidas directamente de los FBRs fueron enviadas y analizadas en el Centro de apoyo tecnológico de la Universidad Rey Juan Carlos en la Unidad de Genómica y Citometría de flujo. El análisis de citometría se realizó con un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, EE.UU) para cuantificar el porcentaje de microorganismos procariotas y

eucariotas y la presencia o ausencia de pigmentos fotosintéticos de las muestras [209, 210]. Para detectar la posible agregación celular de las muestras se realizó un análisis de la dispersión frontal del haz de luz del Forward Scatter y el área que genera al atravesar las células. Puesto que se obtuvo una relación lineal entre la dispersión del FS y el área de dispersión generada se determinó que no existía agregación celular. En estos ensayos no se detectó agregación celular y por lo tanto no fue necesario aplicar ningún tratamiento.

El equipo está dotado con un sensor SS (Side Scatter) y FS (Forward Scatter). La fuente lumínica consiste en un láser rojo (633 nm) y azul (488 nm). Además cuenta con 5 fotodetectores (filtros, FL1-FL5) para la detección de la fluorescencia procedente de los eventos (células). Las muestras se tiñeron con el tinte de ácidos nucleicos SYTO 13 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) para discernir los componentes biológicos de los inertes. El tamaño de las células de la muestra total (50.000 eventos) se analizó a través del FS y la complejidad a través del SS. En este sentido, se usaron como características discriminadoras para discernir entre poblaciones eucariotas y procariotas no solo el tamaño, sino también la complejidad celular. La presencia de clorofila en las muestras se determinó por la emisión de fluorescencia con una longitud de onda aproximada de 675 nm al ser irradiadas con luz roja del láser de HeNe. La emisión de fluorescencia de la molécula de clorofila se detectó con el sensor FL4 para luz roja cercana. Analizando estas características se generaron una serie de diagramas (complejidad celular vs. tamaño y fluorescencia), mediante los que se pudo determinar la composición microbiana de los consorcios.

3.3.3. Secuenciación masiva de ADN MiSeq, Illumina

El tratamiento de las muestras y la extracción de ADN fue el mismo que el de las muestras analizadas con la DGGE. Una vez extraído el ADN, las muestras se enviaron para su secuenciación a través de la plataforma Illumina MiSeq a las instalaciones de Lifesequencing (Paterna, Valencia). Las extracciones de ADN fueron amplificadas con *primers* bacterianos para la captura de las regiones hipervariables V3-V4 del gen de la subunidad 16S del ribosoma. Los primers empleados fueron seleccionados para la detección de bacterias puesto que estos microorganismos procariotas son los principales responsables del tratamiento de aguas residuales [13, 20, 165]. A pesar de la posible existencia de arqueas en los fangos activos, su presencia no fue monitorizada dado que no tienen un papel crucial en la eliminación de carbono y nitrógeno [204, 205].

Para la detección de microalgas fueron empleados *primers* eucariotas para las regiones hipervariables del gen *rbcl* de la RuBisCO para las microalgas. Los *primers* procariotas fueron los empleados por Klindworth *et al.* [211] (*primer forward*: 5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' y el *primer reverse* 5' -GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3'). Los *primers* para la detección de las poblaciones de microalgas tuvieron como diana para el *primer forward* la región 5' -AA Y TCC CAA CCA TTY ATG CG- 3' y para el *primer reverse* la región 5' -CAT ATG CCA AAC RTG AAT ACC 3'. Para determinar el grado de precisión de la identificación para cada nivel taxonómico (filos, familias, género y especies) se realizaron curvas de rarefacción, las cuales indican la cantidad de secuencias analizadas (eje X) y la cantidad de unidades taxonómicas identificadas (eje Y, Figura 3.5). El grado de precisión se obtiene al llegar al estado estacionario en el cuál, la pendiente es próxima a cero, en el que se puede determinar que se han identificado todos los miembros del grupo taxonómico.

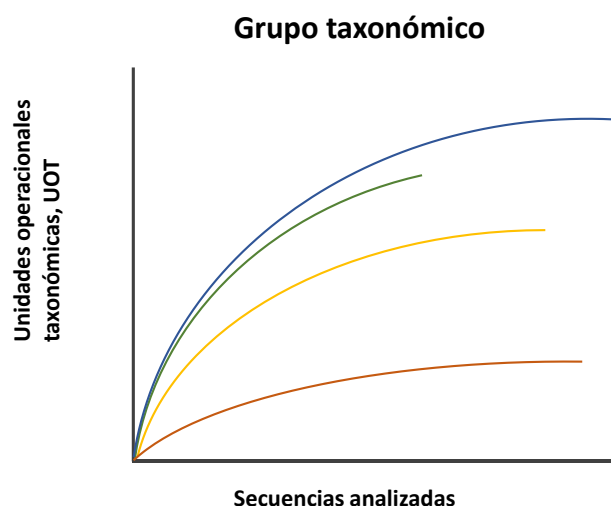


Figura 3.5. Ejemplo de una gráfica de rarefacción para el análisis de la precisión de la caracterización.

Con los datos obtenidos de la secuenciación masiva se generaron gráficas de barras con los taxones presentes en las muestras y su abundancia relativa. En estas gráficas se eliminaron del análisis las secuencias no identificadas con ningún taxón y aquellos grupos que no alcanzaron el 1% de la representación total en al menos una de las muestras analizadas. Con esta técnica también se pudo analizar la biodiversidad de los grupos presentes en los FBRs a través del índice Shannon-Wiener de diversidad, H' , [212].

4. Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1. Efecto de la proporción microalgas-bacterias del inóculo en cultivos en discontinuo

Las aguas residuales empleadas en estos ensayos procedieron del lote 1, cuyas características físico-químicas se describen en el sección de materiales y métodos (Tabla 3.2, Pág. 67). Como se mencionó en el Apartado 3.1.3, los cultivos se inocularon con $0,4 \pm 0,1$ g SSV L^{-1} , utilizando diferentes porcentajes de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*) y bacterias (fango activo) de la siguiente manera: A) 100-0%, B) 75-25%, C) 50-50%, D) 25-75% y E) 0-100% respectivamente. Los cultivos se evaluaron durante 10 días. Los objetivos de estos ensayos fueron:

1. Determinar el efecto de la proporción de microalgas y bacterias (fango activo) en el inóculo sobre el proceso de depuración.
2. Determinar el ratio óptimo de inoculación para el tratamiento de aguas residuales.

Eliminación de materia orgánica (DQO)

En las primeras 24 h, los cultivos que contenían bacterias del fango activo (B-C-D-E) presentaron las mejores tasas de eliminación de DQO_5 sin que se observasen diferencias entre las distintas proporciones iniciales de microalgas-bacterias. Se alcanzaron porcentajes de reducción entre el 77,4 y 88,5%, lo que se corresponde a una eliminación de entre 101,8-117,3 mg $DQO_5 L^{-1} d^{-1}$ (Figura 4.1). En el cultivo A (sólo microalga), tras 24 horas de cultivo, se redujo la DQO en un 32,2%, equivalente a una eliminación de 40,8 mg $DQO_5 L^{-1} d^{-1}$. En los días posteriores se registró un incremento en la concentración de DQO_5 y al final del ensayo se alcanzaron concentraciones superiores a las iniciales (154 frente a los 132,3 mg $DQO_5 L^{-1}$ iniciales), resultando en un rendimiento negativo de eliminación (-16,4%). Este aumento en la concentración de componentes orgánicos en el cultivo se puede deber a la producción por parte de las microalgas de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Según estudios realizados por otros autores, la producción de SPE ocurre cuando las condiciones de intensidad lumínica se encuentran entre 100 y 180 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ [213-215], valores similares a los empleados en el reactor experimental de este estudio (122 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$). Existen referencias en la bibliografía

sobre la capacidad de algunas especies del género *Chlorella* de sintetizar SPE y aumentar el contenido de DQO₅ en los efluentes del tratamiento de aguas [3, 216]

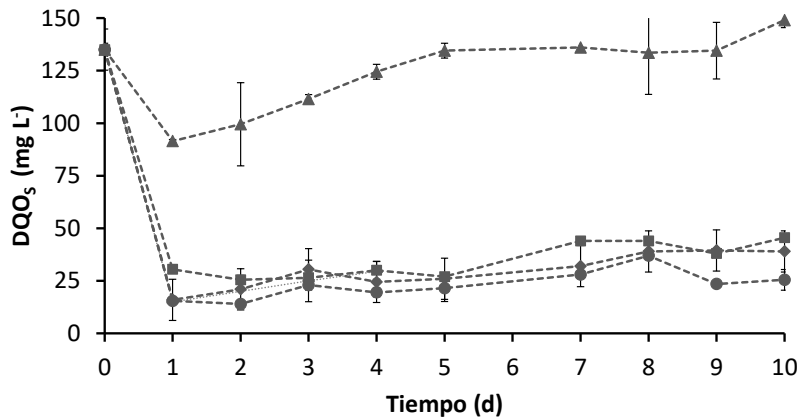


Figura 4.1. Evolución de las concentraciones de DQO₅ y en los ensayos en *batch*. Triángulos (▲) representan el cultivo A (100% microalga-0% bacteria), cuadrados (■) el cultivo B (75% microalga-25% bacteria), rombos (◆) el cultivo C (50% microalga-50% bacteria), círculos (●) el cultivo D (25% microalga-75% bacteria) y guiones (—) el cultivo E (0% microalga-100% bacteria).

La influencia de la composición del inoculó (porcentaje de microalgas-bacterias) en los procesos de tratamiento de agua usando estos consorcios no ha sido documentada en muchos estudios. La rápida disminución de DQO₅ durante las primeras 24 horas de cultivo también se apreció en los cultivos mixtos documentados por Wang *et al.* [161]. A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, estos autores encontraron eliminaciones de DQO casi totales (90 vs. -16%) en los cultivos control de microalgas. Estas diferencias entre los resultados obtenidos en este estudio y los obtenidos por Wang *et al.* [161] puede deberse a las diferentes condiciones en las que se realizaron los experimentos. Estos autores utilizaron agua sintética e inóculos puros de microalgas (*C. sorokiniana*) en combinación con bacterias (fango activo) en proporciones iguales (50-50%) [161]. Además, los autores emplearon acetato como fuente de C, compuesto fácilmente asimilable por la especie *Chlorella sorokiniana*, mediante su metabolismo heterótrofo-mixótrofo, lo que pudo favorecer la eliminación de DQO [73].

Los resultados del trabajo de Su *et al.*, [159] coinciden con los obtenidos en este trabajo, no observándose diferencias significativas en la eliminación de materia orgánica al utilizar inóculos con distintas proporciones de microalgas-bacterias, siempre y cuando ambos

microorganismos (microalgas y bacterias) estén presentes. Sin embargo, en el estudio de Su *et al.*, [159], la eliminación de materia orgánica fue significativamente más lenta que la obtenida en esta tesis doctoral y en el trabajo de Wang *et al.* [161]. A los 4 días de cultivo, estos autores obtuvieron eliminaciones de DQO similares a las alcanzadas en los ensayos B-C-D a las 24 horas de cultivo. Las condiciones experimentales utilizadas por Su *et al.* [159] fueron también diferentes. Utilizaron cultivos en discontinuo con una duración de 8 días y con una intensidad lumínica incidente de $98 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante los primeros 6 días, los autores detectaron una lenta eliminación de la materia orgánica, atribuida a una posible limitación en la cantidad de OD (próxima a cero), condiciones muy alejadas a las del presente estudio (concentración de OD entre 4 y 8 mg L⁻¹, Figura 4.4). Esta escasa concentración de oxígeno pudo deberse a la insuficiente iluminación de los fotobiorreactores, en el rango de foto-limitación para el cultivo de microalgas ($<100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) [217].

Eliminación de nitrógeno amoniacal, N-NH₄⁺

La eliminación de N-NH₄⁺ en los cultivos con presencia de microalgas (A-B-C-D) fue parcial (53,31-58,50%), mientras que en el control bacteriano (E), la eliminación fue prácticamente nula durante los 4 primeros días. A partir de este momento, el cultivo se contaminó con microalgas (Figura 4.2). La incompleta eliminación del N-NH₄⁺ se debe a la poca asimilación directa por parte de los microorganismos causada por la descompensación en la relación C/N que presentan las aguas residuales y la ausencia de fenómenos abióticos de eliminación como la volatilización [47]. Esta afirmación puede corroborarse mediante la realización de un balance de materia para el nitrógeno. En base a los valores medios de eliminación de los cultivos A-B-C-D (Tabla 4.1), la concentración de biomasa de los cultivos (Figura 4.3), y considerando un 5% de nitrógeno en la biomasa de las microalgas característico del cultivo en aguas residuales [41, 95], se determinó que la cantidad de nitrógeno asimilado al final del ensayo fue de $27,0 \pm 5,3 \text{ mg N-NH}_4^+$. Este valor está relativamente próximo a la cantidad media de N eliminado del agua residual por los consorcios ($34 \pm 4 \text{ mg N-NH}_4^+$), indicando que la asimilación fue el mecanismo dominante en la reducción del contenido de nitrógeno. Resultados similares han sido reportados en el estudio realizado por de Godos *et al.* [218] en el cual encontraron que en FBRs cerrados para el tratamiento de purines de cerdo diluidos el principal mecanismo de eliminación de nitrógeno es la asimilación. En el mencionado estudio también encontraron eliminaciones parciales de N-NH₄⁺ comprendidas entre 25-39%, las diferencias con respecto al presente ensayo (53-58%)

pueden ser debidas a la diferente composición de los influentes empleados (agua residual urbana vs. purín de cerdo diluido).

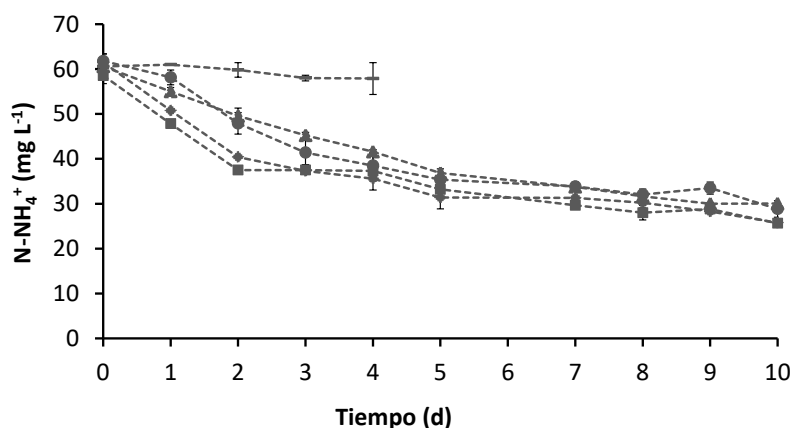


Figura 4.2. Evolución de las concentraciones de N-NH_4^+ y en los ensayos en *batch*. Triángulos (▲) representan el cultivo A (100% microalga-0% bacteria), cuadrados (■) el cultivo B (75% microalga-25% bacteria), rombos (◆) el cultivo C (50% microalga-50% bacteria), círculos (●) el cultivo D (25% microalga-75% bacteria) y guiones (–) el cultivo E (0% microalga-100% bacteria).

Tabla 4.1. Eliminación de nitrógeno en los FBRs A-B-C-D. N_{AR} se corresponde con la concentración del agua residual, N_{elim} con el nitrógeno eliminado y $\text{N}_{\text{Biomasa}}$ con el nitrógeno asimilado en forma de biomasa.

Balance de Nitrógeno <i>batch</i>	$[\text{N}_{\text{AR}}]$	$[\text{N}_{\text{elim}}]$	$[\text{N}_{\text{Biomasa}}]$
Concentración mg N L^{-1}	$60,6 \pm 1,9$	$33,0 \pm 2,2$	$27,0 \pm 5,3$

En los cultivos B-D, la velocidad de eliminación fue mayor durante los 3 primeros días ($6,1 \pm 0,4$ y $7,8 \pm 0,0 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Figura 4.2). El control de microalgas (cultivo A), en el mismo período de tiempo, mostró una velocidad de eliminación de $5,1 \pm 0,1 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De esta manera, los cultivos mixtos, independientemente del porcentaje de inoculación, asimilan N de una manera más rápida que el control de microalgas. Otros autores también observaron una mayor velocidad de eliminación de nitrógeno cuando emplearon consorcios de microalgas-bacterias en comparación con controles únicamente de microalgas (Liang *et al.* [156] y Mujtaba *et al.* [157]). Esta mayor velocidad de eliminación de nitrógeno se pudo deber a los efectos positivos de las bacterias en el desarrollo de las microalgas en los cultivos mixtos. La presencia de determinadas bacterias en los cultivos de microalgas puede contribuir a aumentar la

disponibilidad de carbono inorgánico (CO_2) por oxidación de la materia orgánica [40], o a la secreción de fitohormonas como las auxinas (ácido-3-indolacético) y vitaminas como la biotina, tiamina o la cobalamina (Figura 2.17, Pág. 52) [149-151].

Evolución de la biomasa: sólidos suspendidos volátiles, SSV

Al final del cultivo en *batch* (10 días), se alcanzaron concentraciones de biomasa entre los 0,53-0,62 g SSV L^{-1} , sin encontrarse diferencias significativas entre los distintos cultivos en los que había presencia de microalgas en los inóculos (A-B-C-D, Figura 4.3). Hasta el día 4, todos los cultivos mostraron una cinética de crecimiento similar. El cultivo bacteriano (E), hasta el momento en que se registró la contaminación por parte de microalgas, mostró la misma tendencia que el resto de cultivos. Cabe destacar que la contaminación del control bacteriano pudo deberse a la presencia de microalgas nativas del agua residual, y que, al someterse los influentes a un régimen de cultivo fotótrofo, se facilitó su desarrollo [219]. A partir del cuarto día se observa el cese en el crecimiento de los microorganismos en todas las condiciones ensayadas, estableciendo como límite la concentración de 0,62 g SSV L^{-1} . El bajo contenido en carbono en el medio, tal y como indican los valores mínimos de materia orgánica (25,5-45,5 mg $\text{DQO}_5 \text{ L}^{-1}$ Figura 4.1) y la ausencia de intercambio de CO_2 con la atmósfera en los sistemas cerrados, pueden explicar la inhibición del crecimiento de los microorganismos.

Del mismo modo que lo detectado en la eliminación de materia orgánica y nitrógeno, la producción de biomasa no se vio afectada por la proporción microalgas/bacterias en los inóculos mixtos.

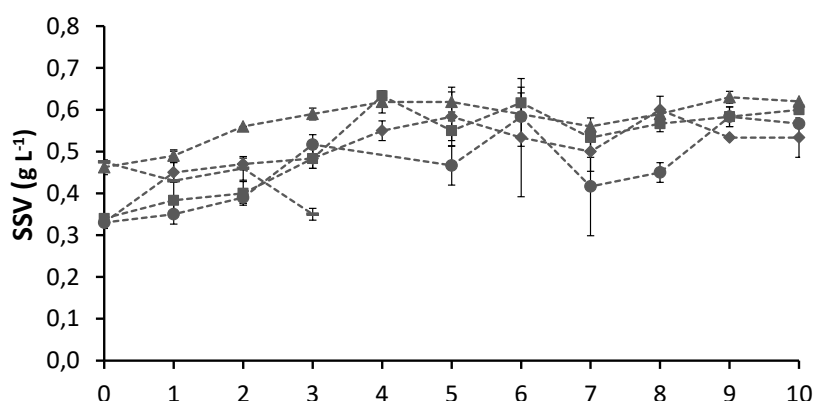


Figura 4.3. Evolución de las concentraciones de SSV en los ensayos en *batch*. Triángulos (▲) representan el cultivo A (100% microalga-0% bacteria), cuadrados (■) el cultivo B (75% microalga-25% bacteria), rombos (◆) el cultivo C (50% microalga-50% bacteria), círculos (●) el cultivo D (25% microalga-75% bacteria) y guiones (-) el cultivo E (0% microalga-100% bacteria).

Evolución del Oxígeno Disuelto (OD) y el pH

La concentración de OD en los cultivos (A-B-C-D) en los que había presentes microalgas mostró valores comprendidos entre 4 y 8 mg O₂ L⁻¹, medidos a las 2 horas de comenzar el periodo de iluminación (Figura 4.4). De esta manera, se comprobó que las microalgas presentes en el cultivo tienen la capacidad de generar el oxígeno suficiente para permitir el metabolismo heterótrofo de las bacterias en los cultivos mixtos [13].

En cuanto al pH (Figura 4.4), a partir del tercer día los valores se estabilizaron en torno a 10 en los cultivos A-B-C-D (aquellos en los que el inóculo contenía microalgas). Estos altos valores de pH alcanzados se deben al efecto alcalinizante de la fotosíntesis y fueron similares a los encontrados en otros estudios similares a escala de laboratorio e industrial [41, 93]. Un pH próximo a 10 supone que el 32% del carbono inorgánico presente en el medio está en forma de CO₃²⁻, el 80% del nitrógeno en forma de NH₃ y el 100% del fósforo en forma de HPO₄²⁻. A los valores de pH obtenidos, el carbono, el nitrógeno y el fósforo se encuentran en formas más difícilmente asimilables por las microalgas (Apartado 2.3.4, Pág. 34).

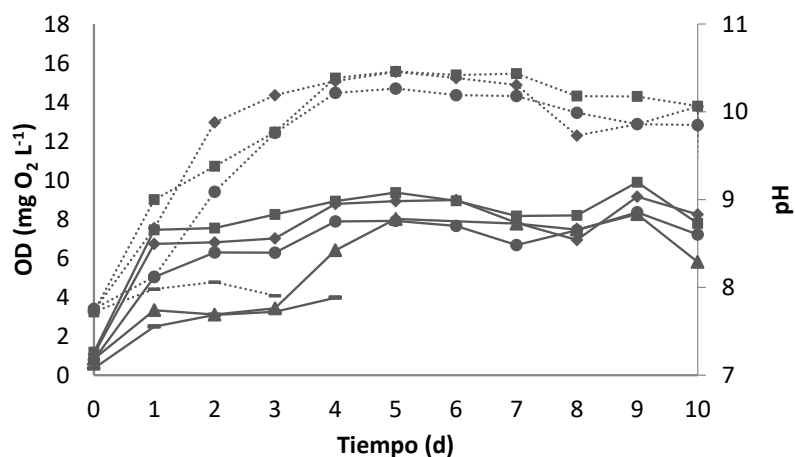


Figura 4.4. Evolución de las concentraciones de OD (—) y pH (••) en los ensayos en *batch*. Triángulos (▲) representan el cultivo A (100% microalga-0% bacteria), cuadrados (■) el cultivo B (75% microalga-25% bacteria), rombos (◆) el cultivo C (50% microalga-50% bacteria), círculos (●) el cultivo D (25% microalga-75% bacteria) y guiones (—) el cultivo E (0% microalga-100% bacteria).

A la vista de los resultados obtenidos en estos experimentos puede concluirse que el porcentaje de microalgas-bacterias de los inóculos mixtos no afecta a la eliminación de DQO₅ y N-NH₄⁺ (a excepción de los inóculos compuestos únicamente por microalgas en los que la materia orgánica aumentó a partir de las 48 h). Estos resultados difieren de los resultados obtenidos por Su *et al.* [159], que encontraron que el inóculo óptimo para el tratamiento de aguas fue 83% microalga y 13% fango activo. Esta discrepancia en los resultados puede deberse a las distintas condiciones en las que se realizaron los experimentos.

A la vista de estos resultados se concluyó que operar los reactores en discontinuo tiene limitaciones para estudiar las relaciones simbióticas entre microalgas y bacterias. El régimen discontinuo es poco representativo de los procesos reales de depuración de agua y el agotamiento de los sustratos (p.e. materia orgánica para las bacterias y de carbono inorgánico para las microalgas) puede afectar al desarrollo de los consorcios. Además, la determinación de parámetros como el OD y el pH de forma puntual en los momentos del muestreo aportan una información limitada de lo que ocurre a lo largo de todo el proceso. Por estos motivos se procedió a realizar los experimentos en semi-continuo que se describen en los siguientes apartados (4.2 y 4.5).

4.2. Cultivos de microalgas-bacterias en FBRs semi-continuos

Se realizaron cultivos en regímenes de alimentación semi-continuo, alimentando una vez al día durante el período de iluminación. Para ello se estudiaron dos TRH: 6 y 3 días. Además de la caracterización en términos de eliminación de parámetros indicadores de depuración, en estos estudios se realizaron mediciones en continuo de OD y pH y se tomaron muestras para realizar análisis (cualitativo y cuantitativo) de las poblaciones microbianas.

4.2.1. Operación en semi-continuo con un TRH 6 días

Como primera aproximación a la operación en semi-continuo se realizó un cultivo por duplicado en FBRs cerrados e inoculados con un consorcio de microalgas-bacterias (25% microalga-75% fango activo), alimentado diariamente con influente procedente del lote 2 con un TRH de 6 d. La sustracción del efluente ocurrió dos horas antes del comienzo del ciclo de luz. La operación duró 23 días con una fase inicial en discontinuo de 5 días para la aclimatación de los consorcios y una operación en semi-continuo de aproximadamente 3 TRH. La finalidad de este experimento fue:

1. Caracterizar los parámetros de depuración empleando un TRH de 6 días
2. Caracterizar la evolución del OD durante el proceso de depuración.

Eliminación de materia orgánica (DQO₅), y evolución del oxígeno disuelto (OD)

Durante los dos primeros días de cultivo, fase en *batch*, se registró una disminución de la materia orgánica disuelta (DQO₅) como consecuencia de la actividad metabólica heterótrofa del consorcio (Figura 4.5). Durante la operación en semi-continuo, la concentración media de materia orgánica en los FBRs aumentó hasta alcanzar una concentración de $168,7 \pm 25,5$ mg DQO₅ L⁻¹, que se mantuvo relativamente estable hasta el final del experimento. Esta concentración en los FBRs supuso una eliminación de $29,7 \pm 10,6\%$. Es un valor bajo en comparación con otros estudios donde se empleó el mismo TRH.

En los estudios de Foladori *et al.* [155, 220], empleando FBRs cilíndricos de 2 L, se obtuvieron eliminaciones de DQO superiores al 85%, indicando un rendimiento muy superior al de este estudio (85 vs. 30%). Los mejores resultados de eliminación de DQO encontrados por

otros autores puede deberse al desarrollo de un consorcio de microorganismos más efectivo para la eliminación de materia orgánica y nutrientes [155, 220]. Wang *et al.* [221] también encontraron valores de eliminación de DQO superiores a los obtenidos en este ensayo (71-84 vs. 30%) en sistemas para el tratamiento de purines de cerdo diluidos operados con un TRH similar al empleado en este estudio (5 d). Estos resultados parecen indicar que, probablemente, el consorcio de microalgas-bacterias desarrollado en los FBRs en los ensayos realizados durante esta experimentación no fuese el más adecuado para la eliminación de materia orgánica.

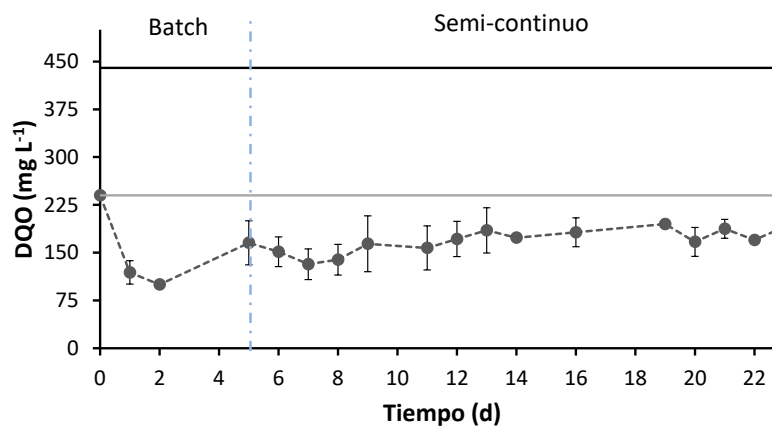


Figura 4.5. Evolución de la DQO durante la operación en FBRs con TRH de 6 d. En línea continua se reflejan los valores de la concentración en el influente de la DQO_T (—) y DQO_S (—). La concentración de DQO_S en el efluente se refleja con línea discontinua (—). La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

El bajo porcentaje de eliminación de DQO_S no puede explicarse por una limitación en la concentración de oxígeno en el cultivo, ya que su concentración fue superior a 2 mg O₂ L⁻¹, valor considerado suficiente para el tratamiento aerobio [13]. La concentración de OD fue superior, o muy superior, al valor limitante anteriormente mencionado, con fuertes variaciones debidas al ciclo de iluminación y régimen semi-continuo (5-23 mg O₂ L⁻¹, Figura 4.6). Estos resultados indican que los microorganismos del consorcio no están eliminando toda la materia orgánica, bien debido a: i) la presencia de materia orgánica no biodegradable procedente del agua residual ii) por la producción dentro del reactor de compuestos orgánicos poco biodegradables, SPE, tales como (galactosa, arabinosa, fucosa, xilosa, manosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico y glicolato [213, 216, 222] y/o iii) a la escasez de microorganismos heterótrofos capaces de degradar los compuestos orgánicos.

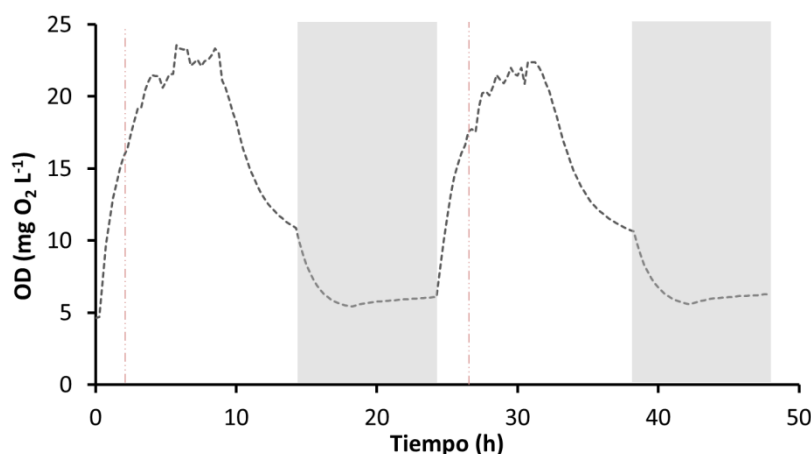


Figura 4.6. Evolución del OD durante la operación en FBRs con TRH de 6 d. La línea discontinua (---) representa la evolución del OD registrado. Los períodos de alimentación se reflejan con la línea discontinua vertical (---). La duración del período iluminación en fondo blanco y los períodos oscuros en fondo gris .

Eliminación de nitrógeno

Durante los días previos a la operación en semi-continuo, la eliminación del N-NH_4^+ fue prácticamente total, situación que se prolongó hasta el día 9 de cultivo (Figura 4.7.A). Esta alta eliminación se debió a que, durante la operación en *batch* (fase inicial de adaptación), se desarrollaron microorganismos nitrificantes que aumentaron la concentración de N-NO_2^- hasta 32 mg L^{-1} (Figura 4.7.A y B). Este aumento pudo deberse a que las condiciones generadas durante la aclimatación favorecieron el desarrollo de las bacterias nitrificantes (autótrofas) (disponibilidad de NH_4^+ , O_2 y CI, Tabla 3.2, Pág. 67). Durante la operación en semi-continuo, la concentración de N-NO_2^- fue disminuyendo hasta alcanzar valores mínimos al final del ensayo, $2,9 \pm 0,3 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (Figura 4.7.B).

Paralelamente a la reducción en la concentración de N-NO_2^- , aumentó el contenido de N-NH_4^+ progresivamente hasta alcanzar una concentración de 27 mg L^{-1} , que se mantuvo relativamente estable durante los últimos días de experimentación ($27\text{-}38 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$). La caída de la concentración de N-NO_2^- pudo estar causada por los valores medios de pH (9,7), poco favorables para estas bacterias (Figura 4.9) [223].

También hay que señalar que las bacterias nitrificantes y las microalgas compiten por los mismos sustratos (NH_4^+ y CO_2), competencia que puede provocar la inhibición de las bacterias [224]. La actividad fotosintética de las microalgas pudo provocar condiciones limitantes en el fotobiorreactor para el crecimiento de las bacterias oxidadoras de NH_4^+ . Este efecto de

competencia por sustrato ha sido previamente descrito en FBRs para el tratamiento de aguas residuales [163, 224]. En consecuencia, la concentración media del NT (N-NO_2^- , N-NO_3^- y N-NH_4^+) en el reactor, durante los últimos 2 TRH, fue de $30,4 \pm 7,9 \text{ mg NT L}^{-1}$. Esta eliminación representó el $56,9 \pm 10,1\%$ del nitrógeno del influente, equivalente a $5,9 \pm 1,1 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figura 4.7.C), similar al obtenido en otros estudios ($6,6\text{-}7,1 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ [220, 225]).

En el trabajo presentado por Anbalagan *et al.* [226] se estudió la eliminación de nutrientes de un agua residual en régimen semi-continuo (TRH de 6 d). Los autores encontraron una eliminación del 81,5% del nitrógeno total en comparación con el 56,9% del presente ensayo. Estas diferencias pudieron deberse a las diferencias en las condiciones de operación ya que en el estudio de Anbalagan se controló el pH mediante adición de CO_2 . La introducción de CO_2 en el cultivo pudo afectar al desarrollo de las poblaciones de microorganismos, promovió la volatilización del amoníaco e incrementó la relación de C/N disponible [226].

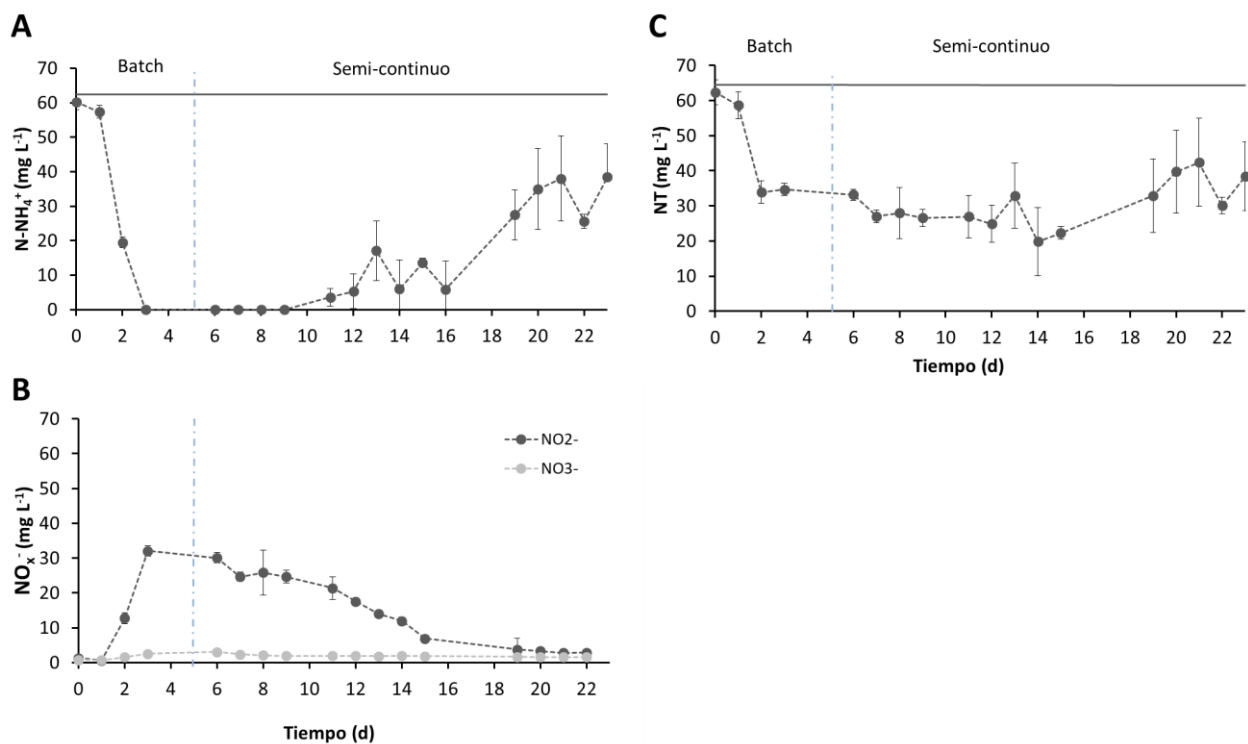


Figura 4.7. Evolución del N-NH_4^+ (A), N-NO_2^- y N-NO_3^- (B) y NT (C) durante la operación en FBRs con TRH de 6 d. La línea gris continua (—) refleja la concentración en el influente de N-NH_4^+ y NT. La línea discontinua (---) representa la concentración de las distintas formas de N en los efluentes. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

En la Figura 4.8 se muestra la evolución del porcentaje de N en cada una de las formas posibles en el efluente (biomasa, NO_x^- , y NH_4^+) en relación al nitrógeno total que se alimenta al reactor. Las pérdidas por volatilización en forma de NH_3 fueron escasas debido a que la operación se realizó cerrada a la atmósfera. Estas pérdidas ocasionales se detectaron durante los últimos 12 días y supusieron, en términos medios, el $11,2 \pm 9,7\%$ del N del influente (Figura 4.8).

El pH medio registrado durante la operación ($\text{pH } 9,7 \pm 0,3$, Figura 4.9) generó que el 73% del N-NH_4^+ se encontrase en forma de N-NH_3 (Ecuación 3.3, Pág. 74). En cambio, en sistemas operados abiertos, el N-NH_3 es eliminado en gran medida a través de la volatilización, pudiendo representar eliminaciones de 30-50% del nitrógeno de los influentes [98, 227].

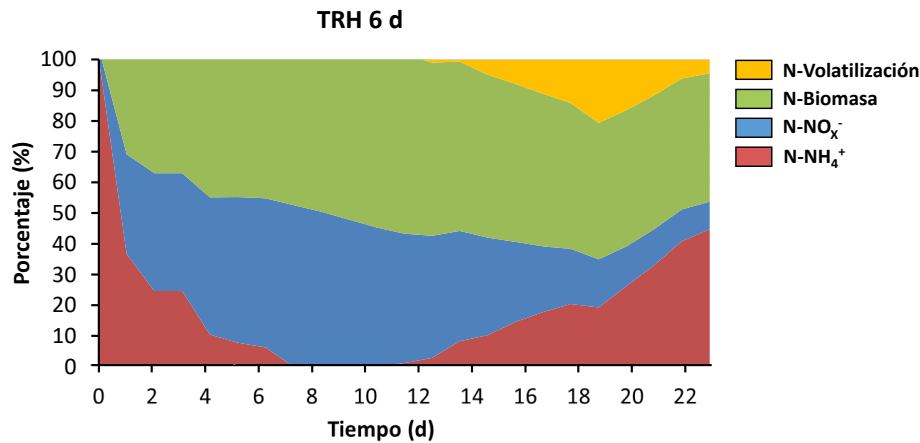


Figura 4.8. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno (%) durante la operación en semi-continuo con TRH de 6 d.

El principal mecanismo de eliminación del N fue la asimilación en forma de biomasa (Figura 4.8). Asumiendo una concentración del 5% de N en la biomasa [41, 95] y una productividad diaria de $0,62 \pm 0,11 \text{ g SSV L}^{-1}$ (Figura 4.10), se obtiene un porcentaje medio de N eliminado por asimilación durante los últimos 2 TRH del $45,7 \pm 6,5\%$. Los resultados observados por de Godos *et al.* [218] en el tratamiento de purines de cerdo diluidos, cerrados al ambiente y operados en semi-continuo coinciden con los encontrados en el presente estudio en que el principal mecanismo de eliminación de nitrógeno es la asimilación en forma de biomasa por parte de los consorcios.

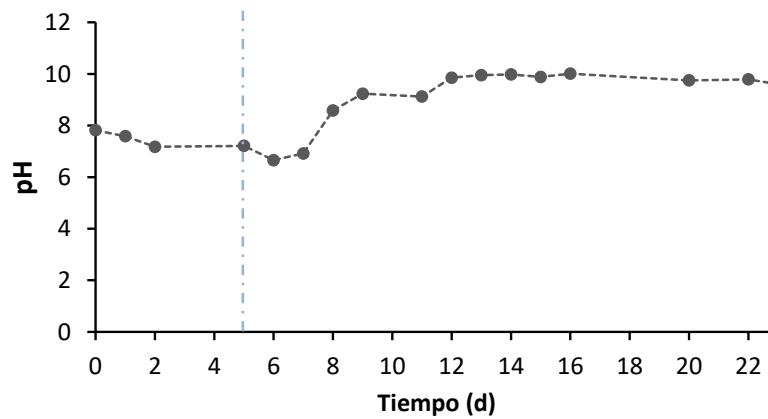


Figura 4.9. Evolución del pH medido de manera puntual durante la operación en FBRs con TRH de 6 d. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Evolución del contenido en biomasa, sólidos suspendidos volátiles, SSV.

Durante el periodo *batch*, previo a la operación en continuo, la concentración de biomasa, cuantificada como sólidos suspendidos volátiles, presentó la misma tendencia que en los ensayos previos (discontinuos): un aumento hasta alcanzar un valor de $0,87 \text{ g SSV L}^{-1}$ (Figura 4.10). En los días de operación sucesivos, con el tratamiento en semi-continuo, la concentración de la biomasa alcanzó un valor promedio de $0,62 \pm 0,12 \text{ g SSV L}^{-1}$. Durante los últimos tres días, la producción de biomasa se estabilizó en torno a un valor medio de SSV de $0,51 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$.

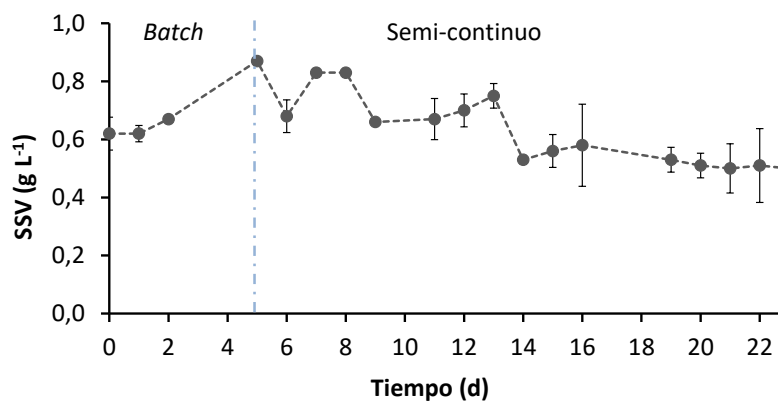


Figura 4.10. Evolución de la biomasa, SSV, durante la operación en FBRs con TRH de 6 d. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Eliminación del fósforo: P-PO_4^{3-}

La concentración de fosfato durante el tratamiento en semi-continuo disminuyó de manera paulatina hasta el día 13 (Figura 4.11). Durante los últimos 9 días de tratamiento, el efluente presentó una concentración de P-PO_4^{3-} de $1,6 \pm 2,2 \text{ mg L}^{-1}$ (inferior a los exigidos por la legislación vigente más restrictiva). Esta concentración supone un porcentaje de eliminación del $87,8 \pm 16,8\%$. Este alto porcentaje de eliminación de P, pudo deberse a la relación N:P en el agua residual (10,7). Este valor se encuentra próximo al rango 6,8-10,0, valor que Wang *et al.*, establecieron como óptimo para la asimilación completa del P por los consorcios microalgas-bacterias [216]. De forma complementaria, los valores medios de pH ($9,7 \pm 0,3$) pudieron favorecer la precipitación del fósforo en forma de estruvitas e hidroxiapatitas [228].

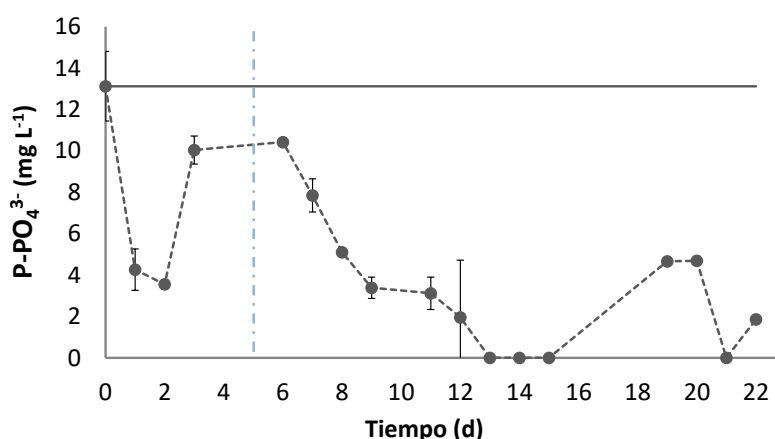


Figura 4.11. Evolución del P-PO_4^{3-} durante la operación en FBRs con TRH de 6 d. La línea continua (—) representa la concentración de P-PO_4^{3-} del influente. La línea discontinua (---) representa la concentración en los efluentes. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

4.2.2. Tratamiento de agua con TRH de 3 días

Debido a los bajos niveles de eliminación de nutrientes y materia orgánica de los ensayos realizados en *batch* y en semi-continuo con un TRH de 6 días, se llevó a cabo un nuevo experimento bajo un régimen de operación semi-continuo disminuyendo el TRH a 3 días. La disminución del TRH se realizó considerando la hipótesis de que TRH prolongados pueden favorecer la producción de SPE y/o limitar el crecimiento de bacterias heterótrofas aerobias.

Cabe destacar que una reducción en el TRH no debe asociarse directamente a una mayor pérdida de procariotas heterótrofos puesto que su tiempo de duplicación está comprendido entre 0,3 y 0,7 d (Tabla 2.5, Pág. 41), considerablemente inferior al nuevo régimen hidráulico evaluado (TRH 3 d). En este sentido, valores de TRH de entre 3 y 8 días han sido empleados en numerosos trabajos destinados al tratamiento de aguas residuales usando diferentes métodos de cultivo [218, 228, 229]. La finalidad de este experimento fue triple:

1. Caracterizar los parámetros de depuración con un TRH de 3 días (Figura 3.3, Pág. 70), empleando agua residual fresca del lote 3 para analizar el comportamiento del sistema en condiciones más realistas de operación. No obstante, el empleo de agua residual fresca constituye un factor que dificulta la comparación con el resto de ensayos. Determinar los límites de biodegradabilidad del agua residual empleada ya que la fracción de DQO₅ no biodegradable contenida en los influentes puede dificultar la obtención de descargas conformes a la legislación más restrictiva.

2. Caracterizar las poblaciones del consorcio microalgas-bacterias. La escasa eliminación de materia orgánica en el experimento previo (TRH de 6 d) pudo deberse también a una carencia de bacterias heterótrofas aerobias en el consorcio. Esta carencia se puede deber a una falta de microorganismos heterótrofos en el inóculo bacteriano (fango activo) o la desaparición de las bacterias heterótrofas durante la operación en semi-continuo. Esta caracterización se hizo a nivel cualitativo (identificación de grupos, especies y su rol metabólico) y cuantitativo (mediante la determinación de la abundancia relativa de los grupos microbianos).

3. Estudiar los intercambios de oxígeno del consorcio microalgas-bacterias mediante una determinación de la evolución de OD (producción/consumo). Las elevadas concentraciones y grandes fluctuaciones de OD observadas en el experimento anterior (entre 7 y 23 mg O₂ L⁻¹, Figura 4.6, Pág. 98), indican una elevada actividad fotosintética de las microalgas respecto al consumo bacterias.

Al igual que en el anterior experimento el inóculo utilizado consistió en un 25% microalga y 75% fango activo con concentración inicial de 0,7 g SSV L⁻¹ en el cultivo. En este caso, la microalga empleada fue una cepa de *Chlorella sorokiniana* aislada de una zona iluminada del decantador primario de la EDAR de Castellón de La Plana (Comunidad Valenciana). La duración del *batch* previo a la operación en semi-continuo fue de 48 h. La duración de la operación en semi-continuo se prolongó durante 6,3 tiempos de residencia hidráulicos, para asegurar la estabilidad del sistema.

Eliminación de materia orgánica, DQO₅

La operación con un TRH de 3 d, empleando los consorcios microalgas-bacterias, resultó en una concentración relativamente constante de DQO₅ en los efluentes de $177,2 \pm 28,3 \text{ mg L}^{-1}$, suponiendo una eliminación media del $35,5 \pm 10,3\%$ (Figura 4.12). A pesar de la diferente composición de los influentes y el TRH, estos valores son similares al experimento anterior (TRH de 6 d, Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Concentración de DQO₅ en los influentes, en los efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d.

Eliminación de materia orgánica	TRH 6 d	TRH 3 d
Concentración influente (mg DQO ₅ L ⁻¹)	$240,0 \pm 5,3$	$290,2 \pm 123,0$
Concentración biodegradable influente (mg DQO ₅ L ⁻¹)	-	$176,2 \pm 8,5$
Concentración efluente (mg DQO ₅ L ⁻¹)	$168,7 \pm 25,5$	$177,2 \pm 28,3$
Porcentaje de eliminación	$29,7 \pm 10,6$	$35,5 \pm 10,3$
Porcentaje eliminación Biodegradable	-	$64,2 \pm 4,8$

En el estudio realizado por Méndez *et al.* [228] en el que se empleó un TRH de 3 días, los autores encontraron eliminaciones parciales de materia orgánica, similares a las del presente

ensayo (entre 35-45% vs. 36%). Dichos autores asumieron que las eliminaciones parciales de materia orgánica encontradas en su estudio se debieron a que las microalgas inoculadas solo tuvieron la capacidad de eliminar los compuestos orgánicos más simples, permaneciendo en el medio los compuestos más complejos. En el trabajo mencionado no tuvieron en cuenta el efecto de la carga bacteriana presente en el agua residual, por lo que la baja eliminación de DQO pudo deberse, no solo a la baja eliminación de materia orgánica por parte de las microalgas, sino también a la presencia de compuestos orgánicos difícilmente biodegradables en los influentes [13].

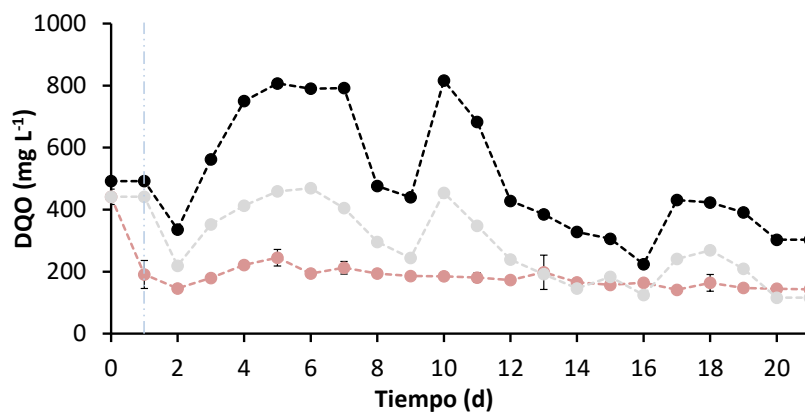


Figura 4.12. Evolución de la DQO durante la operación en FBRs con TRH de 3 d. En línea discontinua se reflejan los valores de la concentración de la DQO_T (—) y la DQO_S (—) en los influentes. La DQO_S de los efluentes se representa con línea discontinua roja (—). La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Dado que los porcentajes de eliminación de materia orgánica fueron considerablemente bajos, se procedió a determinar la fracción de DQO_S biodegradable del agua residual empleada. Con este fin, se desarrolló un ensayo de biodegradabilidad (Apartado 3.1.3, Pág. 67). Como se aprecia en la Figura 4.13, la concentración mínima de DQO_S (equivalente a DQO_S no biodegradable) alcanzó un valor de $114,2 \pm 8,5 \text{ mg L}^{-1}$. Más concretamente, este valor supone el 60,7% de la DQO_S total, similar a los valores reportados para aguas urbanas [13]

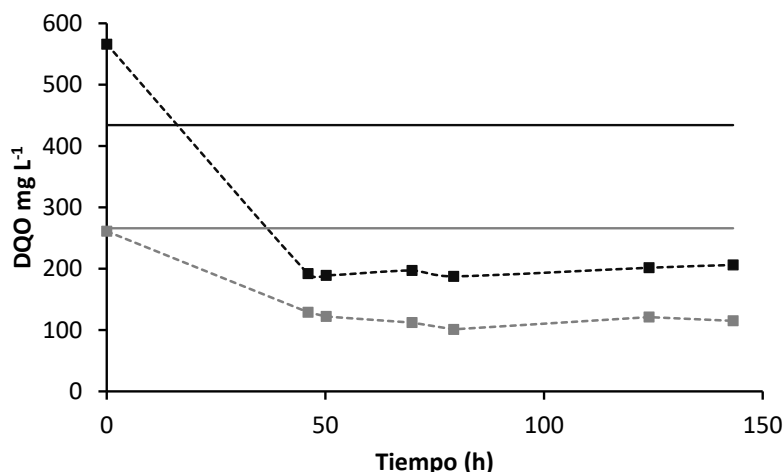


Figura 4.13. Ensayo de biodegradabilidad de una muestra del lote 3. Las líneas continuas representan la DQO inicial del agua residual: DQO_T (—) y DQO_S (—), mientras que las líneas discontinuas muestran la concentración de la DQO en el reactor: DQO_T (---) y DQO_S (---).

El ensayo de biodegradabilidad del agua del lote 3 muestra una fracción considerable de la DQO_S no puede ser eliminada biológicamente. Este hecho implica, que en un proceso de depuración eficiente utilizando consorcios de microalgas-bacterias, podrían alcanzarse concentraciones próximas al valor $114,0 \pm 8,5 \text{ mg L}^{-1}$, significativamente inferiores al valor encontrado ($177,2 \pm 28,3 \text{ mg L}^{-1}$). Teniendo en cuenta la concentración de la fracción biodegradable de la DQO_S presente en el influente ($176,2 \text{ mg DQO}_S \text{ L}^{-1}$) y la del efluente ($63,0 \text{ mg DQO}_S \text{ L}^{-1}$) la eliminación de DQO_S biodegradable supuso únicamente el $64,2 \pm 4,8\%$.

Las bajas eliminaciones de la fracción biodegradable de la DQO_S no se deben a una limitación de las bacterias heterótrofas por escasez de oxígeno. De forma análoga a los resultados obtenidos en el experimento previo, las medidas de OD en continuo mostraron concentraciones de $2\text{-}37 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, muy superiores a los necesarios para la eliminación de materia orgánica en condiciones aerobias ($2\text{-}4 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ [13]). Por lo tanto, estos resultados podrían estar reforzando la hipótesis de la probable ausencia o carencia de bacterias heterótrofas consumidoras de materia orgánica en los consorcios. La posible carencia de microorganismos heterótrofos explicaría la escasa eliminación de materia orgánica biodegradable procedente del influente o la generada por el propio consorcio (SPE). Esta probable falta de microorganismos heterótrofos, igualmente, pudo deberse a una carencia en el inóculo bacteriano (fango activo) o la desaparición durante la operación.

Eliminación de nitrógeno

En estos FBRs, operados con TRH de 3 d, todo el nitrógeno estaba en forma de $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NH}_3$, evidenciando la inexistencia de nitrificación en el reactor. La ausencia de nitrificación con respecto al ensayo previo pudo deberse a una combinación de factores que afectasen a las poblaciones de bacterias nitrificantes como los cambios en las condiciones experimentales (TRH e influentes), los pH alcalinos registrados (9,4 y 11,0) [27, 223] o la competición por sustratos (CI) con las microalgas [163, 224]. Debido a que el pH durante la operación fue elevado (Figura 4.17, Pág. 111), la forma predominante de nitrógeno fue el amoníaco, siendo éste un elemento potencialmente tóxico para los microorganismos fotosintéticos [80]. A pesar de la mayor presencia del N-NH_3 frente al N-NH_4^+ , la concentración media de nitrógeno en los efluentes resultó ser de $10,0 \pm 7,7 \text{ mg N L}^{-1}$. Estos resultados suponen un porcentaje de eliminación de nitrógeno total del $71,4 \pm 20,3\%$ (Figura 4.14 y Tabla 4.3), y en términos de flujo másico, la cantidad de nitrógeno eliminado fue de $7,4 \pm 3,0 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Estos resultados son similares a los obtenidos por Beydeş y Karapinar ($3,6\text{-}7,1$ vs. $5,1\text{-}7,2 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) con un desarrollo experimental similar [225]).

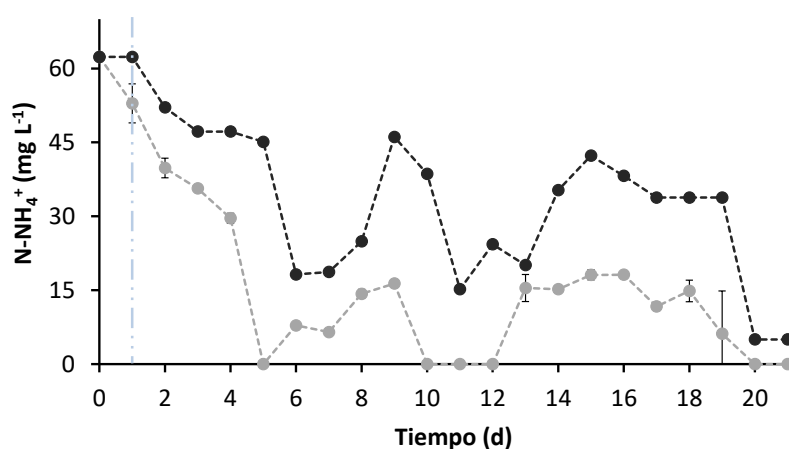


Figura 4.14. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ durante la operación en FBRs con TRH de 3 d. La línea discontinua gris oscura (—) representa la concentración en el influente. La línea discontinua gris clara (—) representa la concentración en el efluente. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Tabla 4.3. Concentraciones de N-NH_4^+ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación en los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d.

Eliminación de nitrógeno	TRH 6 d	TRH 3 d
Concentración influente (mg $\text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	$62,3 \pm 2,3$	$36,2 \pm 18,2$
Concentración efluente (mg $\text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	$34,0 \pm 7,8$	$10,0 \pm 7,7$
Porcentaje en biomasa	$45,7 \pm 6,5$	$54,5 \pm 21,2$
Porcentaje en pérdidas (volatilización)	$11,2 \pm 9,7$	$16,9 \pm 12,1$
Porcentaje de eliminación	$56,9 \pm 10,1$	$71,4 \pm 20,3$

Como en el caso anterior, con TRH de 6 d, a pesar de las diferentes condiciones experimentales, el principal mecanismo de eliminación fue la asimilación en forma de biomasa ya que en el biorreactor cerrado se dificultó la volatilización del $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. El contenido en nitrógeno de la biomasa analizada fue del 5,1%, valor similar al aportado por González-Fernández *et al.* [41]. Por lo tanto, la eliminación por asimilación en forma de biomasa (últimos 3 TRH), supuso el $54,5 \pm 21,2\%$ con respecto al nitrógeno incorporado en el influente (Figura 4.15.A). Este porcentaje de eliminación por asimilación fue ligeramente superior al encontrado en el anterior ensayo (55 vs. 46%, Figura 4.15.B, Tabla 4.3) y al 40,6% reportado por Woertz *et al.*, [230], debido probablemente a las diferencias en las condiciones experimentales. Pese a la operación en cerrado, las pérdidas por volatilización supusieron el $16,9 \pm 12,1\%$ (Figura 4.15.A) del nitrógeno presente en el influente.

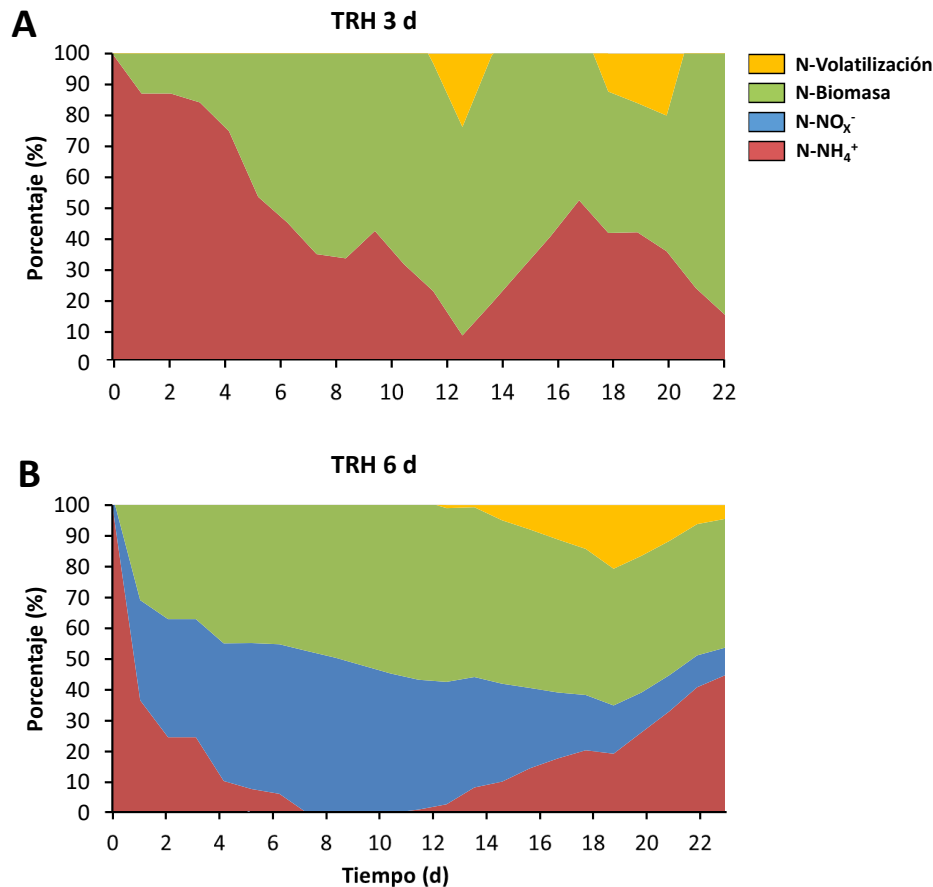


Figura 4.15. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno (%) durante la operación en semi-continuo con TRH de 3 d (A) y TRH de 6 d (B).

Evolución de la biomasa: sólidos suspendidos volátiles

El consorcio se estableció rápidamente. Durante los dos días de aclimatación (*Batch*), los FBRs adquirieron un color verde intenso y se impusieron las condiciones aerobias (datos de OD no mostrados). La concentración de SSV, durante los últimos 6 días de operación, fue de $0,29 \pm 0,06$ g SSV L⁻¹ (Figura 4.16), aproximadamente la mitad con respecto al experimento donde se empleó TRH de 6 d.

Por ejemplo, dependiendo de las condiciones de iluminación y la velocidad de dilución, los SSV encontrados en FBRs tipo *raceway*, alimentados con agua residual urbana, suelen oscilar entre $0,15$ - $0,45$ g L⁻¹ [58, 231]. A escala de laboratorio Méndez *et al.* [228], con un TRH de 3 d, encontraron concentraciones ligeramente superiores ($0,42$ g SSV L⁻¹) a los $0,29$ g SSV L⁻¹ del presente estudio. Estas diferencias pueden deberse al diferente método de agitación por aireación utilizado por Méndez *et al.* [228] que aumenta la disponibilidad de CO₂ en el cultivo, favoreciendo así el desarrollo de las microalgas.

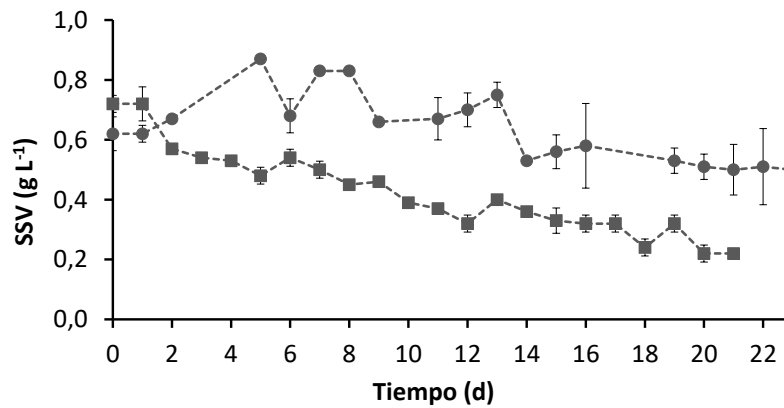


Figura 4.16. Evolución de la biomasa, SSV, durante la operación en FBRs con TRH de 3 d (■) y TRH de 6 d (●).

Evolución del pH y las especies de carbono inorgánico, CI

A partir de los valores de pH se determinó la concentración de las diferentes formas en las que se puede encontrar el CI en el medio de cultivo (Figura 2.7, Pág. 36). Para la representación gráfica de la evolución del pH, HCO_3^- y CO_3^{2-} , se han seleccionado los días 12 y 13 de operación (Figura 4.17). Durante toda la experimentación, el pH alcanzó valores especialmente altos, con máximos en los momentos previos a la adición de agua residual fresca ($10,8 \pm 0,3$) y al final del período de iluminación ($10,4 \pm 0,2$). En cambio, los valores mínimos, se obtuvieron al final del periodo de oscuridad ($9,45 \pm 0,2$) y justo después del período de alimentación ($9,7 \pm 0,1$). En la Figura 4.17 se aprecian las fluctuaciones diarias de las concentraciones de HCO_3^- y CO_3^{2-} , simultáneas a las variaciones del pH.

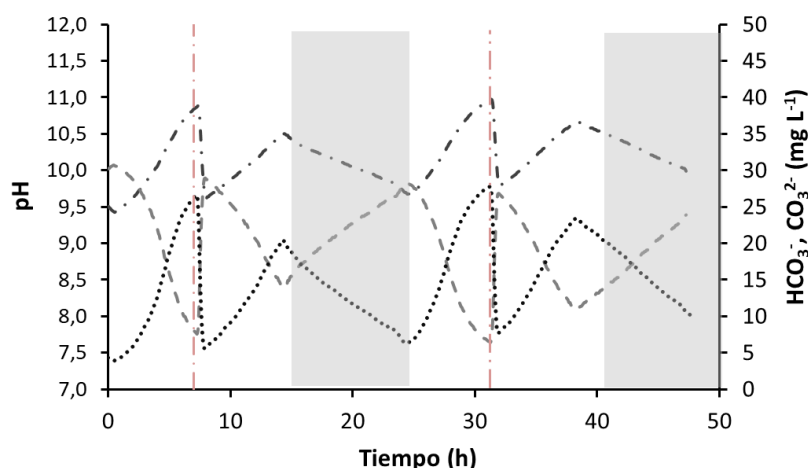


Figura 4.17. Evolución del pH (—●—), HCO_3^- (---) y CO_3^{2-} (···) en el FBR operado con TRH de 3 d. Los períodos de alimentación se reflejan con la línea discontinua vertical (—). La duración del período iluminación se representan en fondo blanco □ y los períodos oscuros en fondo gris ■.

Los valores mínimos de HCO_3^- (forma asimilable por las microalgas a diferencia del CO_3^{2-}) se observaron antes de la adición de agua residual y al final del ciclo de luz ($7,3 \pm 0,4$ y $12,4 \pm 2,2$ mg $\text{HCO}_3^- \text{ L}^{-1}$, respectivamente). Los valores máximos se detectaron después del período de oscuridad y de la alimentación $30,3 \pm 3,1$ y $26,6 \pm 4,1$ mg L^{-1} . Estos resultados pueden explicarse por el aporte de CI ($46,0 \pm 5,6$, Tabla 3.2, Pág. 67) y materia orgánica que supone la alimentación de influente fresco que sería oxidada a CO_2 por los microorganismos heterótrofos. Este CO_2 , como consecuencia de los valores elevados de pH, se transformaría en su mayor parte en forma de HCO_3^- .

Al contrario, la máxima concentración el CO_3^{2-} se produjo antes de la alimentación de influente y al final del período de iluminación (25,6 y 19,6 mg L^{-1}) como consecuencia de los valores más básicos del pH. Debido a los valores de pH registrados, la concentración de CO_2 libre fue muy baja durante toda la operación ($>0,02$ mg L^{-1} de acuerdo con el equilibrio). El bajo nivel de HCO_3^- puede ser un factor que reduzca la actividad fotosintética al ser el principal substrato carbonatado en medios líquidos. De acuerdo con los estudios publicados por Goldman *et al.* la inhibición de la fotosíntesis por escasez de carbono sucede a concentraciones entre 1 y 2 mg $\text{HCO}_3^- \text{ L}^{-1}$ [232]. En este ensayo, las concentraciones mínimas de este componente se mantuvieron siempre por encima del umbral de limitación (7,3 mg $\text{HCO}_3^- \text{ L}^{-1}$, previo a la adición de influente).

Eliminación del fósforo: P-PO_4^{3-}

El tratamiento con los consorcios microalgas-bacterias en FBRs permitió reducir la concentración de fosfato hasta $1,7 \pm 1,3 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ en el efluente, suponiendo un porcentaje de eliminación del $51,9 \pm 27,1\%$ (Figura 4.18, Tabla 4.4). A partir del día 10, cuando el reactor estaba en estado estacionario, la eliminación aumentó hasta el $68,3 \pm 25,2\%$ manteniendo concentraciones en los efluentes de $1,1 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabla 4.4. Comparativa entre las concentraciones de P-PO_4^{3-} en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d.

Eliminación de fósforo	TRH 6 d	TRH 3 d
Concentración influente (mg $\text{P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)	$13,1 \pm 1,7$	$4,9 \pm 3,6$
Concentración efluente (mg $\text{P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)	$1,6 \pm 2,2$	$1,1 \pm 0,8$
Porcentaje de eliminación (%)	$87,8 \pm 16,8$	$68,3 \pm 25,2$

Las concentraciones observadas en los efluentes en este ensayo ($1,1 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) son coherentes con las publicadas por Méndez *et al.* empleando *C. vulgaris* y el mismo régimen hidráulico ($2,0 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) [228]. Estos buenos resultados pueden deberse al escaso contenido en fosfato del influente del lote 3 que se traduce en una relación N:P del influente de 22, superior al rango mínimo establecido para la eliminación por asimilación de este componente (10) [216]. Además, cabe destacar que los elevados valores de pH (máximos de $10,8 \pm 0,3$, Figura 4.17), como ocurría en el ensayo previo a pesar del mayor régimen hidráulico (TRH de 6 d), pudieron favorecer la eliminación por precipitación del fósforo. Tanto la precipitación como la asimilación por parte de los consorcios generaron efluentes con concentraciones medias por debajo del límite marcado por la legislación más restrictiva ($<2 \text{ mg P L}^{-1}$, Tabla 2.3, Pág. 13).

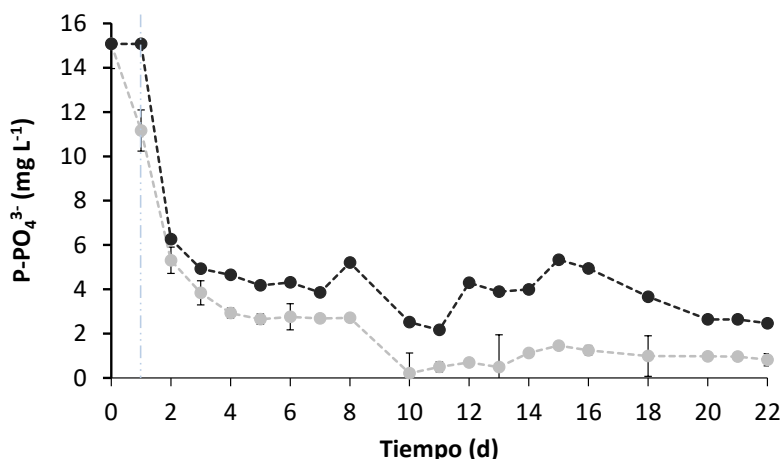


Figura 4.18. Evolución de la concentración de P-PO_4^{3-} durante la operación en FBRs con TRH de 3 d. La línea discontinua gris oscura (---) representa la concentración en el influente. La línea discontinua gris clara (---) representa la concentración en el efluente. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

4.3. Caracterización de los consorcios vía DGGE y CF

Una posible hipótesis para la baja eliminación de materia orgánica puede deberse a la ausencia microorganismos heterótrofos capaces de consumir la fracción biodegradable de la materia orgánica del agua residual o los componentes orgánicos producidas por el propio consorcio (SPE). Esta escasez de microorganismos heterótrofos puede ser consecuencia de un escaso contenido en microorganismos heterótrofos en el inóculo debido a un posible mal estado o que los elevados valores de OD y pH que se producen durante la operación de los FBRs inhiben el desarrollo de este tipo de microorganismos. En todo caso, para verificar estas hipótesis se necesita una caracterización cualitativa y cuantitativa de las poblaciones establecidas durante la operación.

Las técnicas de biología molecular desarrolladas en las últimas décadas han sido fundamentales para la caracterización de muestras ambientales complejas, como las muestras procedentes del tratamiento de aguas residuales. Estas técnicas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida por la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) [165, 233]. Con esta técnica se analizaron las muestras de los días 0 (inicio, t_0), 14 (intermedio, t_{14}) y 22 (final, t_{22}) de operación. A pesar de la robustez de la DGGE, ésta solo aporta información cualitativa sobre la composición poblacional (filogenia) y no sobre la abundancia relativa de los diferentes tipos de microorganismos [234]. La citometría de flujo (CF), empleada en estudios ambientales y taxonómicos [235], es una técnica adecuada para el análisis

de la abundancia relativa de las poblaciones de microorganismos con fines biotecnológicos [236].

4.3.1. Evolución cualitativa de la población microbiana (DGGE)

Para estudiar la evolución de la población microbiana durante el tratamiento de aguas residuales en términos cualitativos (identificación de taxones microbianos), se analizaron tres muestras obtenidas del FBR durante su operación en semi-continuo.

En las Figura 4.19 y Figura 4.20 se muestran las bandas de la electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE). La identificación de los grupos taxonómicos se realizó por similitud de las secuencias obtenidas con las disponibles en la base de datos del NCBI: 75% para filo, 78,5% para clase, 82,0% para orden, 86,5% para familia, 94,5% para género y 98,7% para especies [237]. Las secuencias obtenidas fueron incorporadas a la base de datos del NCBI. Las secuencias eucariotas están disponibles con los números de acceso MF373499-MF373510 y las procariotas con los códigos MF102237-MF102253.

DGGE eucariota

Se aislaron doce bandas procedentes del gel eucariota, purificadas, amplificadas y secuenciadas (Figura 4.19). Todas ellas estaban estrechamente relacionadas con la filogenia *Eukaryota*; *Viridiplantae*; *Chlorophyta*; *Trebouxioophyceae*; *Chlorellales*; *Chlorellaceae* y correspondían con el género *Chlorella* y con la especie *C. sorokiniana*. Las bandas 1 y 4 a 6, debido al porcentaje de similitud (96-98%), solo se pudo determinar hasta el rango de género, *Chlorella* (Tabla 4.5). El resto de bandas presentaron una similitud con las de la base de datos del 99-100%. De este modo, se pudo lograr identificar el rango de especie, coincidiendo con *C. sorokiniana*.

Neilson *et al.*, [234] describieron de manera detallada los problemas más frecuentes que se pueden encontrar al emplear la DGGE como método de identificación microbiana. Los autores determinaron que una misma secuencia, al ser amplificada, puede generar secuencias idénticas con diferentes conformaciones estructurales, produciendo diferentes patrones de desnaturalización que afectan a la migración en el gel [234]. Éste puede ser el motivo por el que las bandas 2 y 7 a 10 guardan gran similitud con la cepa CMBB151 ([KY921856.1](#)) de *C. sorokiniana*

(99-100%, Tabla 4.5), pero que en el gel migraron de manera distinta. Se puede determinar de esta manera que el género *Chlorella* representado por la especie *C. sorokiniana* fue el dominante durante todos los días de muestreo. Los resultados obtenidos con la técnica DGGE en el presente ensayo coinciden con la dominancia de un único tipo de microalga. Este fenómeno ha sido previamente descrito por otros autores en distintos sistemas para el tratamiento de agua residual urbana [108, 120, 238].

La dominancia de *C. sorokiniana*, en todos los días de muestreo, puede deberse a su elevada capacidad para desarrollarse en aguas residuales. Prueba de ello son los numerosos estudios en los que se ha utilizado o encontrado esta especie de alga verde [158, 216, 218, 239-242]. La frecuente presencia de esta especie en aguas residuales puede deberse a su elevada velocidad de crecimiento ($0,74 \text{ d}^{-1}$ [243]) o a su tolerancia a componentes tóxicos presentes en las aguas residuales como el amoníaco [244, 245].

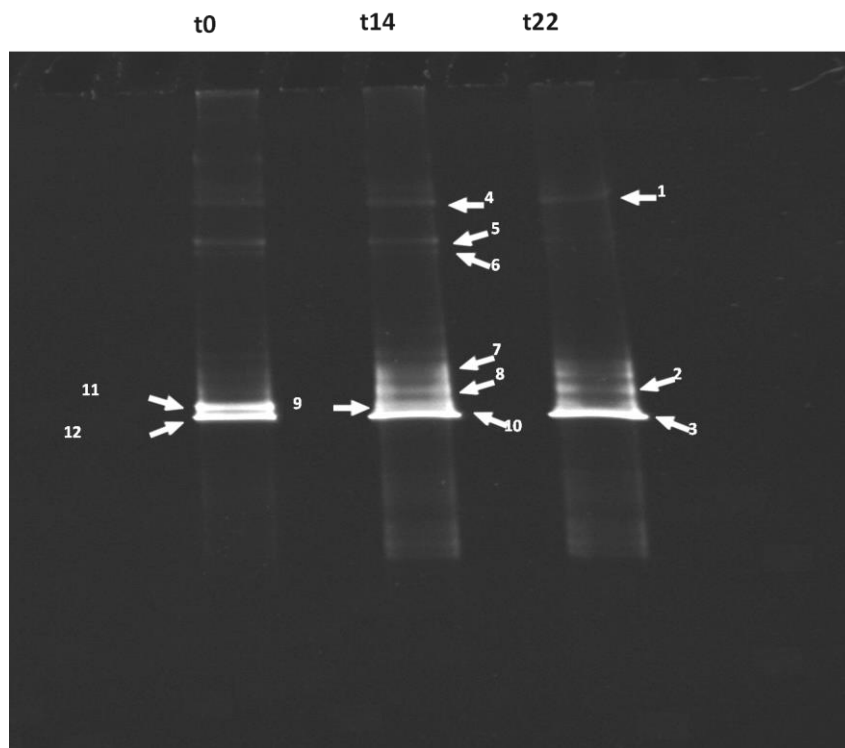


Figura 4.19. Gel electroforético desnaturizante (DGGE) para organismos eucariotas. Amplificación del fragmento del gen ribosomal 18S. En la parte superior, los números hacen referencia a los carriles correspondientes a cada muestra; t0, t14 y t22. Las bandas secuenciadas fueron numeradas y señaladas con flechas.

Tabla 4.5. Bandas identificadas del gel electroforético desnaturizante eucariota. Columnas de izquierda a derecha: número de banda en la DGGE, parentesco más próximo a cada banda, similitud entre la secuencia de las bandas y el familiar más próximo.

Banda	Parentesco más próximo	Similitud (%)
B1	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	99
B2	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	100
B3	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	100
B4	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	96
B5	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	98
B6	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	98
B7	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	100
B8	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	99
B9	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	99
B10	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	99
B11	<i>Chlorella sorokiniana</i> cepa CMBB151 (KY921856.1)	99
B12	<i>Chlorella</i> sp. AN 7-7 (AY195967.1)	99

DGGE procariota

Del gel electroforético de microorganismos procariotas, se aislaron, amplificaron y secuenciaron 16 bandas (Figura 4.20). De éstas, 15 aparecieron relacionadas con el filo *Proteobacteria* (α -*Proteobacteria*) y 1 con el filo *Bacteroidetes*.

En el estudio presentado por Wang *et al.* [161], previamente mencionado, también observaron la presencia de la clase α -*Proteobacteria*. A pesar de esta concordancia, estos autores hallaron una mayor abundancia de otros filos-clases: 3 especies de *Bacteroidetes*, 4 de γ -*Proteobacteria*, 3 de α -*Proteobacteria* y 1 de *Firmicutes*. Estos filos no se han observado en este estudio. Estas diferencias en términos de diversidad de filos-clases se pudo deber a las diferentes condiciones aplicadas a los cultivos o al diferente fango activo utilizado como inóculo.

Wang *et al.* [161] emplearon cultivos en *batch* (48 h), mientras que en este trabajo se emplearon regímenes semi-continuos de cultivo para simular las condiciones reales del proceso de depuración. El método y tiempo de cultivo empleado por Wang *et al.* no favorece la selección de microorganismos que se produce por efecto de renovación del efluente en los reactores, de tal forma que no favorece la dominancia de microorganismos afines a las condiciones impuestas por la actividad fotosintética (elevados valores de pH y OD). Como se aprecia en este ensayo, la operación en semi-continuo en reactores cerrados promueve fuertes fluctuaciones en el OD y en el pH. Estas condiciones pueden ejercer una presión selectiva sobre las poblaciones microbianas (valores de OD máximos de 37,1 mg L⁻¹ y pH máximos de entre 9,4 y 11,0, Figura 4.17, Pág. 111). Por el contrario, en el estudio de Wang *et al.* este efecto fue atenuado debido a la corta duración del ensayo y a la aireación de los cultivos [161].

Debido al carácter fotótrofo de la operación cabría esperar identificar microorganismos fotosintéticos del filo *Cyanobacteria* [163, 240]. A pesar de que los *primers* empleados 338f y 805r son de carácter generalista y tiene como diana la región V7 y V8 del gen ribosomal 16S, no fueron encontradas este tipo de bacterias.

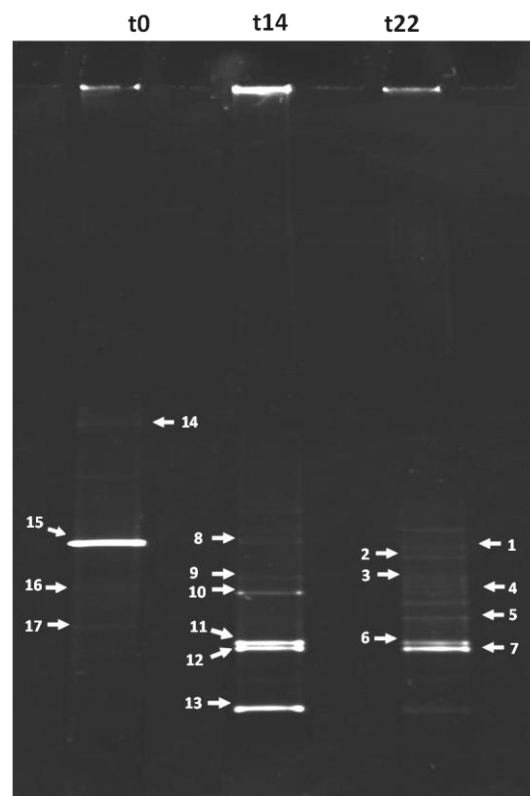


Figura 4.20. Gel electroforético desnaturalizante (DGGE) para organismos procariotas. Amplificación del fragmento del gen ribosomal 16S. En la parte superior los números hacen referencia a cada muestra; t0, t14 y t22. Las bandas secuenciadas fueron numeradas y señaladas con flechas.

Filo *Bacteroidetes*

En la DGGE procariota (Figura 4.20) se identificaron 3 bandas en el carril de la muestra t0 (inicio del cultivo), 6 en el correspondiente a 14 días de operación (t14), y 7 bandas al final de la operación (t22). La única banda perteneciente a *Bacteroidetes* fue la banda 14, registrada únicamente en la muestra inicial, t0, procedente del fango activo (Figura 4.20, Tabla 4.6). Este grupo bacteriano se caracteriza por presentar metabolismos anaerobios o micro-aerobios y es habitual en la flora intestinal de animales y, por lo tanto, también es frecuente en aguas residuales y más concretamente en los fangos activos [168, 246, 247].

La secuencia obtenida de la banda 14 (carril de la muestra t0) está estrechamente relacionada con la familia *Flavobacteriaceae*. Los miembros de *Flavobacteriaceae*, en especial, los miembros del género *Flavobacterium* son frecuentes en heces, en aguas residuales y en plantas depuradoras [246, 248]. Los componentes de esta familia suelen habitar en suelos donde descomponen la materia orgánica, siendo capaces de degradar polisacáridos como almidón, pectina, celulosa, agar, quitina, xilanos y proteínas como la queratina [248-250]. El que no se encuentren en las muestras t14 y t22 pudo deberse a que su metabolismo heterotrofo está condicionado a ambientes micro-aerobios, por lo que las elevadas concentraciones de OD, como las encontradas durante el tratamiento fotosintético (37,1 mg O₂ L⁻¹, Figura 4.24, Pág. 129), pudieron provocar un medio hostil para su desarrollo [248, 251].

Clase α -*Proteobacteria*

De las 16 bandas secuenciadas, 15 pertenecieron a la clase α -*Proteobacteria*. Aunque la presencia de este grupo fue detectada en todos los días del cultivo, la mayor abundancia de bandas se correspondió a las muestras t14 y t22, en las que se encontraron 6 y 7 bandas, respectivamente (Figura 4.20, Tabla 4.6). Una distribución similar fue encontrada en el estudio de Lakaniemi *et al.* donde de las 24 bandas encontradas, 15 pertenecieron a este filo, mientras que solo una al filo *Bacteroidetes* [164].

Dentro de las α -*Proteobacteria*, la familia *Rhizobiaceae* fue identificada en 3 bandas secuenciadas, procedentes de la muestra t0 (bandas 15 a 17, Figura 4.20, Tabla 4.6) en las que se espera una dominancia de las bacterias procedentes del fango activo empleado como inóculo. La banda 15 resultó estar estrechamente relacionada con la especie *Shinella zoogloeoides* (con un 99% de similitud) y la banda 16 con *Shinella fusca* (con un 96% de similitud).

Cabe destacar que *Shinella* (anteriormente conocido como *Zoogloea*) es un grupo de bacterias heterotrofas abundantes en los fangos activos [168, 252, 253]. Por lo tanto la existencia de miembros de *Flavobacteriaceae* y *Shinella* en la muestra inicial demuestra que los reducidos niveles de eliminación de materia orgánica no se deben a una falta de microorganismos heterótrofos en el fango activo usado como inoculo, ni tampoco a un mal estado del mismo. Su desaparición en las muestras procedentes del tratamiento refuerzan la hipótesis de que las condiciones aerobias generadas en los FBRs no favorecen su desarrollo.

En cambio, la secuencia de la banda 10, obtenida de la muestra t14, estuvo estrechamente relacionada con un miembro no cultivable de la familia *Sphingomonadaceae* con una similitud del 92%. Los miembros de esta familia presentan un metabolismo aerobio y quimiotrofo y su presencia podría favorecer la eliminación de materia orgánica en el tratamiento de aguas. A pesar de esta característica favorable de *Sphingomonadaceae* para la depuración, la eliminación de materia orgánica (DQO₅) biodegradable en el FBR durante este período fue de 64,2%, evidenciando una incompleta degradación aerobia como se ha comentado en el Apartado 4.2.2 (Pág. 104).

La clase *α-Proteobacteria*, como ha sido mencionado en la introducción (Apartado 2.3.2, Pág. 31), son un taxón amplio y diverso de bacterias. Su diversidad es tal que algunos miembros son conocidas como bacterias púrpuras fotótrofas y tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis anoxigénica [83, 84]. Estos microorganismos además pueden consumir componentes orgánicos a través de su metabolismo heterótrofo. Debido a la capacidad que las bacterias púrpuras fotótrofas tienen para la eliminación de nutrientes y materia orgánica han sido empleadas en recientes y novedosos estudios para el tratamiento de aguas residuales urbanas [83, 84]. Esta característica metabólica les confiere una ventaja adaptativa en ambientes acuáticos con abundante radiación solar [81]. Su presencia fue detectada en las muestras t14 y t20, correspondientes a la operación en semi-continuo. Estos tipos de microorganismos tienen la capacidad de realizar una fotosíntesis en la que el subproducto no es el oxígeno. Por este motivo, la fotosíntesis de este grupo se denomina anoxigénica y la realizan gracias a la molécula de bacterioclorofila [82]. De las 15 bandas aisladas pertenecientes a esta clase, 9 resultaron estar íntimamente relacionadas con el orden *Rhodobacterales*, con similitudes comprendidas entre el 86-99% (bandas 1 a 5, 7, 9, 12 y 13), de las cuáles 8 pertenecieron a la familia *Rhodobacteraceae* (Tabla 4.6). La presencia de los miembros de esta familia de microorganismos fue anteriormente descrita en el tratamiento de agua residual en FBRs y en lagunas de estabilización de aguas residuales [82, 254]. Dos bandas se asociaron al género *Roseobacter* (bandas 7 y 12) y una a *Paracoccus* (banda 13). La presencia de estos

géneros en el FBR pudo deberse a que *Roseobacter* es un género ubicuota caracterizado por formar parte del bacterioplancton de ambientes costeros y por sintetizar bacterioclorofila [255]. En la versión original la explicación de los tipos de sustratos que pueden consumir las bacterias fotótrofas púrpuras fue incompleta. Estos tipos de microorganismos presentan un metabolismo fotoanoxigénico (sin producción de oxígeno) en el que usan materia orgánica como donador de electrones. Aunque estos microorganismos se caracterizan por emplear como sustratos moléculas orgánicas, estos se limitan a sustancias de bajo peso molecular como los ácidos grasos volátiles (acetato) y alcoholes [83, 84]. Por lo tanto las moléculas de elevado peso molecular presentes en las aguas, no pueden ser eliminadas por estos microorganismos. De esta manera, el rango de sustratos que son capaces de eliminar es inferior al de las bacterias heterótrofas que componen los fangos activos. Este hecho sugiere que las condiciones particulares encontradas en los FBRs constituyen importantes factores selectivos que determinan la comunidad bacteriana.

Los resultados de la DGGE señalan la ausencia de miembros de la clase *β-Proteobacteria*, grupo considerado como responsable de la eliminación de materia orgánica y nutrientes, y de otros filos frecuentes en los fangos activos de las EDAR como *Bacteroidetes* y *Firmicutes* [247, 256]. En las muestras representativas del tratamiento (t14 y t22) tampoco se encontraron bandas pertenecientes a *Shinella*, *α-Proteobacteria* frecuente en los fangos activos [168, 252, 253]. El método de operación de los FBRs (cerrados a la atmósfera), generaron condiciones altamente selectivas para el desarrollo de los microorganismos micro-aerobios o aerotolerantes (elevados valores de pH y de OD, Figura 4.17 Figura 4.24, Págs. 111 y 129, respectivamente). Estas condiciones desarrolladas podrían explicar estos resultados y las relativamente altas concentraciones de DQOs encontradas en los reactores ($177,2 \pm 28,3$ mg DQO L⁻¹, Tabla 4.2). Por lo tanto, los valores de pH y OD pueden limitar la presencia de microorganismos con metabolismos micro-aerobios o con escasa aerotolerancia como la clase *β-Proteobacteria*, y los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* [247, 256]. Del mismo modo, los elevados valores de OD también causan la eliminación de microorganismos patógenos anaerobios como *Arcobacter*, *Aeromonas*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Franciella*, *Leptospira*, *Vibrio*, *Klebsiella* o *Escherichia coli* [247, 257, 258].

Tabla 4.6. Bandas identificadas del gel electroforético desnaturalizante procariota. Columnas de izquierda a derecha: Filogenia, número de banda en la DGGE, parentesco más próximo a cada banda, similitud entre la secuencia de las bandas y el familiar más próximo y el tipo de estudio en el que se identificó.

Filogenia	Banda	Parentesco más próximo	Similitud (%)	Ambiente
<i>α-Proteobacteria</i>				
	B1	<i>Rhodobacter</i> sp. cepa (KX246923.1)	87	Evaluación del riesgo de daño de pintura
	B2	<i>Falsirhodobacter deserti</i> cepa W402 (KF268394.1)	85	Aislado de suelo arenoso
	B3	<i>Paracoccus limosus</i> cepa M177 (LN997993.1)	87	Aislado de ordeñadoras lecheras
	B4	<i>Catellibacterium</i> sp. JPB-2.07 (EU652478.1)	95	Estudio del tratamiento de desechos porcinos
	B5	<i>Falsirhodobacter deserti</i> cepa W402 (KF268394.1)	90	Evaluación del riesgo de daño de pintura nigeriana
	B6	<i>α-Proteobacterium</i> no cultivable, clon B-5-27 (KF826986.1)	99	Aislado en un estudio sobre el efecto de la salinidad en biofilms bacterianos
	B7	<i>Roseobacter</i> sp. no cultivable, clon MZ4P9S19-c04 (KF851207.1)	99	Aislado de acuífero rico en NH ₄ ⁺
	B9	<i>Paracoccus</i> sp. TM12 (KC294118.1)	90	Aislado en estudio bacterias resistentes al cobre y al antimonio
	B10	<i>Sphingomonadaceae</i> no cultivable clon bacteriano T312A9 (HM438362.1)	92	Aislado de suelo contaminado con antraceno
	B11	<i>α-Proteobacterium</i> no cultivable, clon B76 (KF411692.1)	98	Aislada de una EDAR
	B12	<i>Roseobacter</i> sp. B11 (DQ659411.1)	99	Aislado en estudio sobre fotoheterotrofos marinos
	B13	<i>Paracoccus</i> sp. PML02 (KF648894.1)	98	Aislado en estudio sobre bacterias endofíticas resistentes a arsénico
	B15	<i>Shinella zoogloeoides</i> cepa JB27 (KX161838.1)	99	Aislado en planta de tratamiento de agua residual de coque
	B16	<i>Shinella fusca</i> cepa ADC-27A (KM210268.1)	96	Aisladas del fango activo de una EDAR
	B17	<i>Rhizobium</i> sp. cepa PZS S01 (KY660579.1)	93	Aislado de nódulos endofíticos de distintos tipos de acacias
<i>Bacteroidetes</i>				
	B14	<i>Chryseobacterium hominis</i> strain PW 107 (KY660579.1)	89	Aislado de estudio poblacional del agua dulce

4.3.2. Evolución cuantitativa de la población microbiana: Citometría de flujo (CF)

Como se mencionó previamente, la técnica DGGE es muy adecuada para determinar la composición microbiana de las muestras ambientales. Sin embargo, la información que puede aportar en términos de abundancia de cada grupo microbiano es limitada [234]. Por lo tanto, el empleo de la técnica de CF aportó una valiosa información en términos cuantitativos sobre la composición del consorcio microbiano y su evolución durante el proceso de depuración.

Atendiendo a las características analizadas de complejidad y tamaño celular (eucariotas/procariotas) detectadas a través del *Side Scatter* y *Forward Scatter* y presencia/ausencia de pigmentos fotosintéticos a través de la detección de fluorescencia, se generaron una serie de diagramas (tamaño vs. complejidad y fluorescencia) con los que se determinaron los porcentajes de las poblaciones eucariotas fotosintéticas y de bacterias con y sin pigmentos. El eje X representa la complejidad celular detectada por el *Side Scatter* (SS), mientras que el eje Y representa el tamaño celular detectado por el *Forward Scatter* (FS). Ambos ejes permiten clasificar a los microorganismos en procariotas y eucariotas. Además, la emisión de fluorescencia roja permite la detección de los microorganismos que presentan pigmentos fotosintéticos. En este estudio se analizaron cuatro muestras que se corresponden a los días 0 (inicial t0), 8 y 14 (intermedio) y 22 (final, t22) de operación.

Evolución de los microorganismos eucariotas/procariotas

Los microorganismos al comienzo del cultivo, t0, se corresponden con los inoculados en el reactor. Como se puede apreciar en la Figura 4.21.A, el inóculo estaba compuesto en un 86,0% por microorganismos procariotas frente a un 14,0% de eucariotas (de los cuales la totalidad se correspondían con microalgas). Este porcentaje es diferente a la relación de masas inoculada (25% microalga y 75% bacteria), debido a que el tamaño de los procariotas (bacterias) es mucho menor que el de las células eucariotas (microalgas, 5-50 μm [72]). Estos porcentajes fueron variando durante la operación de tal forma que en el octavo día de cultivo (t8, Figura 4.21.B) el porcentaje de procariotas se redujo hasta el 69,9%, mientras que los eucariotas (microalgas) se duplicaron hasta alcanzar el 30,1% de las células analizadas. A las dos semanas de cultivo, (t14, Figura 4.21.C), se registró el mínimo porcentaje de microorganismos procariotas (42,7%), mientras que las microalgas alcanzaron su máximo (57,4%). Sin embargo, en la muestra del día

22, se detectó una disminución del porcentaje de microalgas (t22, Figura 4.21.D). A pesar de estas fluctuaciones propias de las aguas residuales empleadas, cabe destacarse que las microalgas mantuvieron la predominancia en el cultivo. Esta abundancia de microalgas, con respecto a las poblaciones procariotas, podría contribuir a explicar las bajas eliminaciones de materia orgánica registradas en los FBRs (Tabla 4.2, Pág. 104).

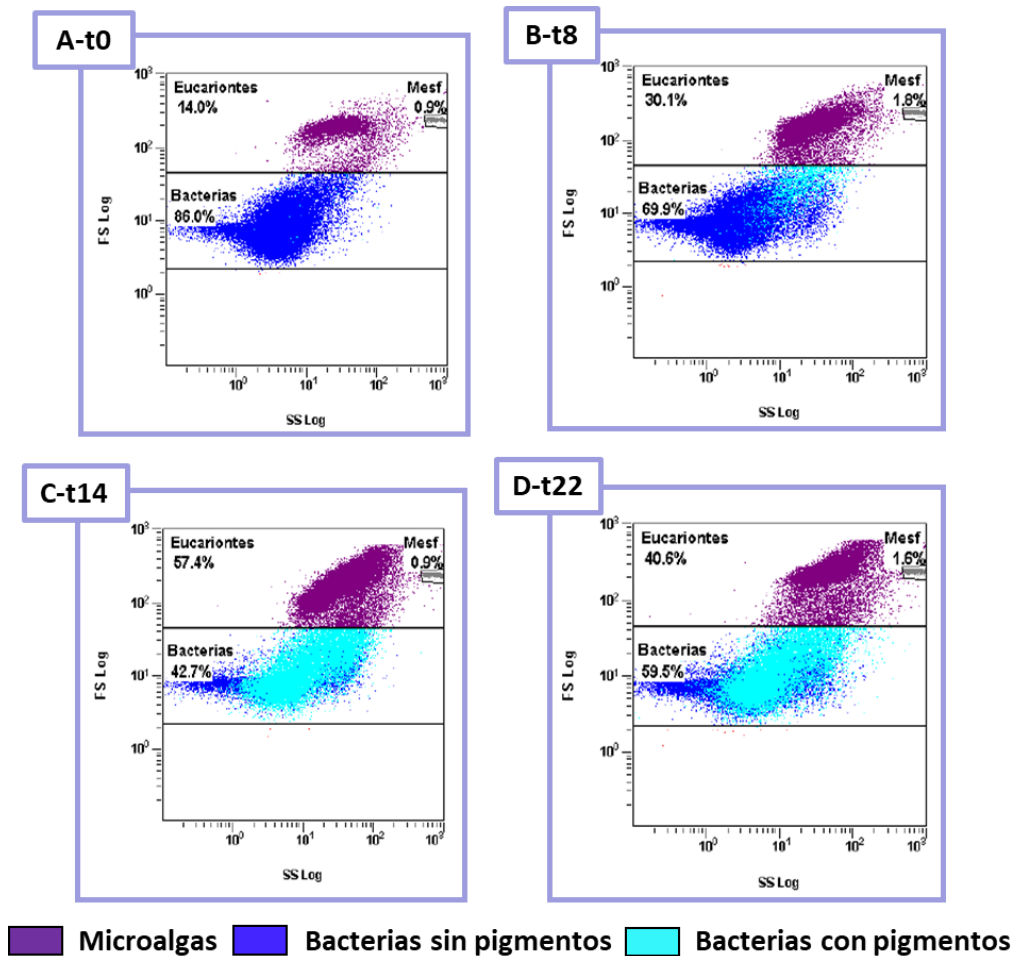


Figura 4.21. Distribución de los microorganismos atendiendo al reino de pertenencia a lo largo de la operación en semi-continuo con TRH de 3 d. La gráfica A representa la distribución de microorganismos en la muestra t0, la B después de 8 días de operación, la C después de 14 y la D se corresponde con la muestra final (22 días).

Procariotas fotosintéticos

Atendiendo a la presencia y ausencia de pigmentos de las poblaciones procariotas, durante la operación de los FBRs se detectó una evolución favorable de bacterias fotosintéticas

(Figura 4.22). Como se puede ver en la Figura 4.22.A, al comienzo del experimento, la práctica totalidad de los microorganismos procariotas carecían de pigmentos, por lo tanto sin capacidad fotosintética, (99,9%), ya que se trataba de bacterias procedentes del inóculo de fango activo (*Shinella*). Después de dos TRH (Figura 4.22.B), el porcentaje de las bacterias fotosintéticas se situó en 4,8% frente al 95,2% de procariotas no fotosintéticos. El máximo porcentaje de procariotas fotosintéticos (74,3% del total) se alcanzó después de dos semanas de cultivo (Figura 4.22.C), al igual que en el caso de las microalgas (Figura 4.22.C). Inversamente, el porcentaje de procariotas no fotosintéticos disminuyó hasta el 25,7%. En el último día de cultivo (día 22), el porcentaje de procariotas fotosintéticos fue de 55,9% (Figura 4.22.D).

Las condiciones particulares de los FBR, cerrados del ambiente (elevado pH y OD), promovieron el desarrollo y la dominancia de microorganismos procariotas fotosintéticos frente a los procariotas carentes de pigmentos fotosintéticos procedentes de inóculo de fango activo.

Los resultados aportados por la CF son consistentes con los resultados cualitativos de la DGGE (*α -Proteobacteria*). Ambas técnicas coinciden en la presencia y dominancia de bacterias características del fango activo en la muestra inicial (*Shinella*, carente de pigmentos fotosintéticos) y la dominancia de microorganismos fotosintéticos (tanto microalgas como bacterias) en las muestras procedentes del tratamiento. La información obtenida mediante la DGGE y la CF relativa a la abundancia y los tipos de microorganismos pueden explicar los bajos porcentajes de eliminación de la fracción biodegradable de la DQO₅ (64,2%) que se traducen en bajas eliminaciones de materia orgánica obtenidas en los FBRs.

Aunque las bacterias fotosintéticas *α -Proteobacteria* tienen la capacidad de eliminar materia orgánica (AGVs), no se caracterizan por tener un amplio rango de utilización de sustratos como fuente de carbono [85], por lo que no pueden asimilar los componentes de las SPE (galactosa, arabinosa, fucosa, xilosa, manosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico y glicolato [213, 216, 222]) puestas en evidencia en los ensayos en *batch*.

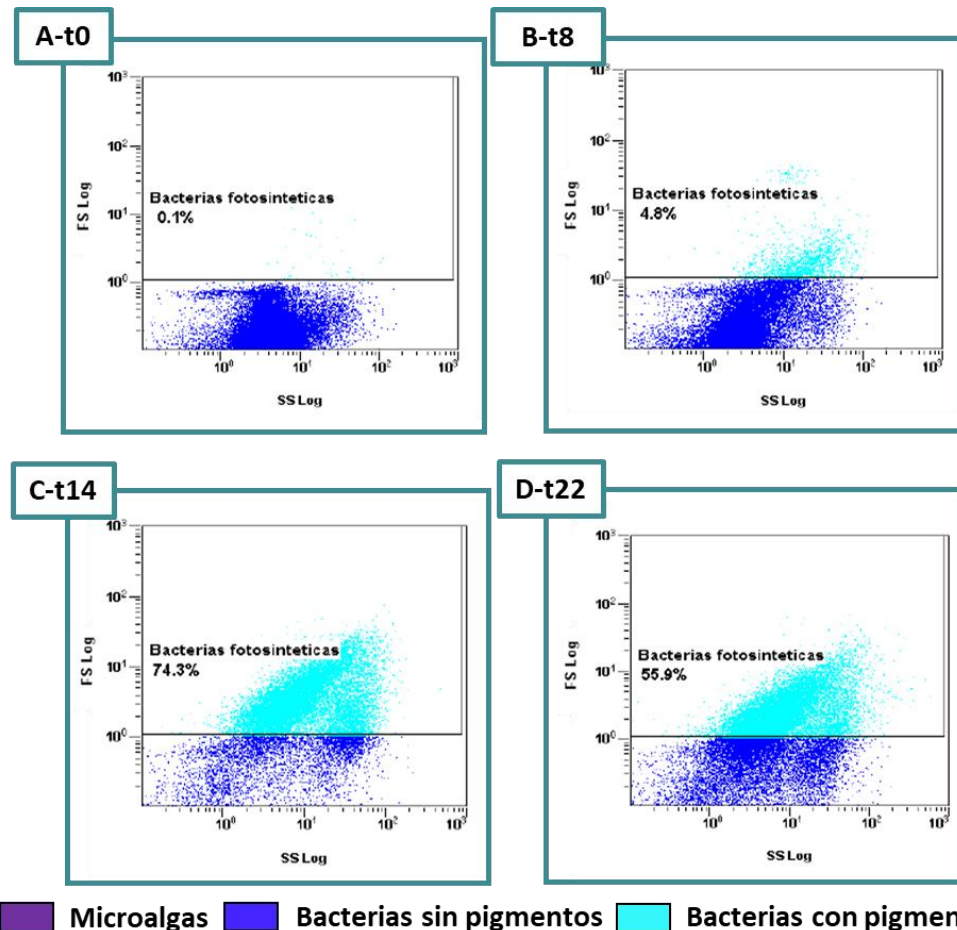


Figura 4.22. Distribución de los microorganismos procariotas en función de la presencia ausencia de los pigmentos fotosintéticos a lo largo de la operación en semi-continuo con TRH de 3 d.

4.3.3. Evolución del consorcio: microalgas-bacterias

Tanto los resultados obtenidos mediante la técnica DGGE y la CF, señalan la abundancia y dominancia de los microorganismos fotoorganotrofos sobre los microorganismos especializados en la degradación de materia orgánica, característicos de los sistemas de tratamiento (heterótrofos aerobios). Estos resultados no se ajustan estrictamente a la simbiosis de los consorcios microalgas/bacterias descrita inicialmente por Oswald y Gotass en 1957 y aceptada por sucesivos investigadores [40, 145]. La dominancia de las bacterias púrpuras fotótrofas de la familia *Rhodobacteraceae* (α -Proteobacteria) observada en este estudio invita a adaptar la idea generalmente aceptada de una simbiosis microalgas-bacterias basada simplemente en el intercambio de gases (O_2 y CO_2) (Figura 4.23).

La dominancia del género *Shinella*, género con metabolismo heterótrofo, en la muestra procedente del t0 indica que el inóculo de fango activo contenía microorganismos

especializados en la eliminación de materia orgánica. En la operación de los FBRs cerrados, y como consecuencia de la actividad fotosintética de *C. sorokiniana* y el establecimiento de bacterias púrpuras fotótrofas (familia *Rhodobacteraceae*), la producción de oxígeno superó la del consumo bacteriano, generando una acumulación del OD ($37,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, 464%). Cabe destacar que este no es un fenómeno exclusivo de los reactores cerrados, ya que se han documentado concentraciones de hasta $40 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (500% de saturación de OD) en reactores *raceways* [259]. Este exceso de oxígeno provoca el decaimiento de las bacterias con metabolismo micro-aerobio, especializadas en la eliminación de materia orgánica como los miembros del filo *Bacteroidetes* o el género *Shinella* procedentes del inóculo de fango activo. Al mismo tiempo, estas condiciones fomentan el desarrollo de las bacterias púrpuras fotótrofas incapaces de degradar los componentes orgánicos de mayor peso molecular. Al no existir en los FBRs condiciones que fomenten la presencia de microorganismos especializados en la oxidación de materia orgánica no se produjo su completa transformación en CO_2 .

Asimismo, como se describió en la introducción, en estas condiciones, la fotorrespiración de las microalgas pudo verse potenciada por el déficit de carbono y exceso de OD. Este proceso conduce a la pérdida de moléculas de carbono previamente asimiladas (hasta el 25% [90, 129]) y además desencadena la liberación de NH_4^+ , aumentando el contenido en nitrógeno de los efluentes (Apartado 2.3.4, Pág. 48) [130]. Como consecuencia, el crecimiento de las microalgas pudo verse comprometido y, con éste, la eliminación de nutrientes de las aguas. Una posible solución para la eliminación del NH_4^+ podría ser la operación con FBRs abiertos al ambiente. Este tipo de operación podría reducir la sobresaturación de oxígeno y promover la volatilización del NH_3 , forma en la que se encuentra de manera mayoritaria el nitrógeno a pH alcalinos (Figura 2.9, Pág. 38).

De manera complementaria, la alta concentración de materia orgánica en los efluentes tras el proceso de depuración, (Tabla 4.2, Pág. 104), pudo deberse también a la producción de SPE. Esta producción ha sido observada por otros autores en estudios de tratamiento de aguas con el género *Chlorella* [222]. La producción de SPE como respuesta a intensidades de luz relativamente bajas como las empleadas en este ensayo ($122 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ha sido descrita por varios autores para diferentes microalgas [213-215]. La producción de SPE podría estar contribuyendo a aumentar la concentración de DQO_5 de los efluentes mediante la liberación de compuestos difícilmente biodegradables [213, 216, 222]. Las bacterias mayoritarias (bacterias púrpuras fotótrofas) no son capaces de oxidar estos componentes a CO_2 y por ello, en estos experimentos, se observa una escasa eliminación la materia orgánica (DQO_5) en el reactor [85].

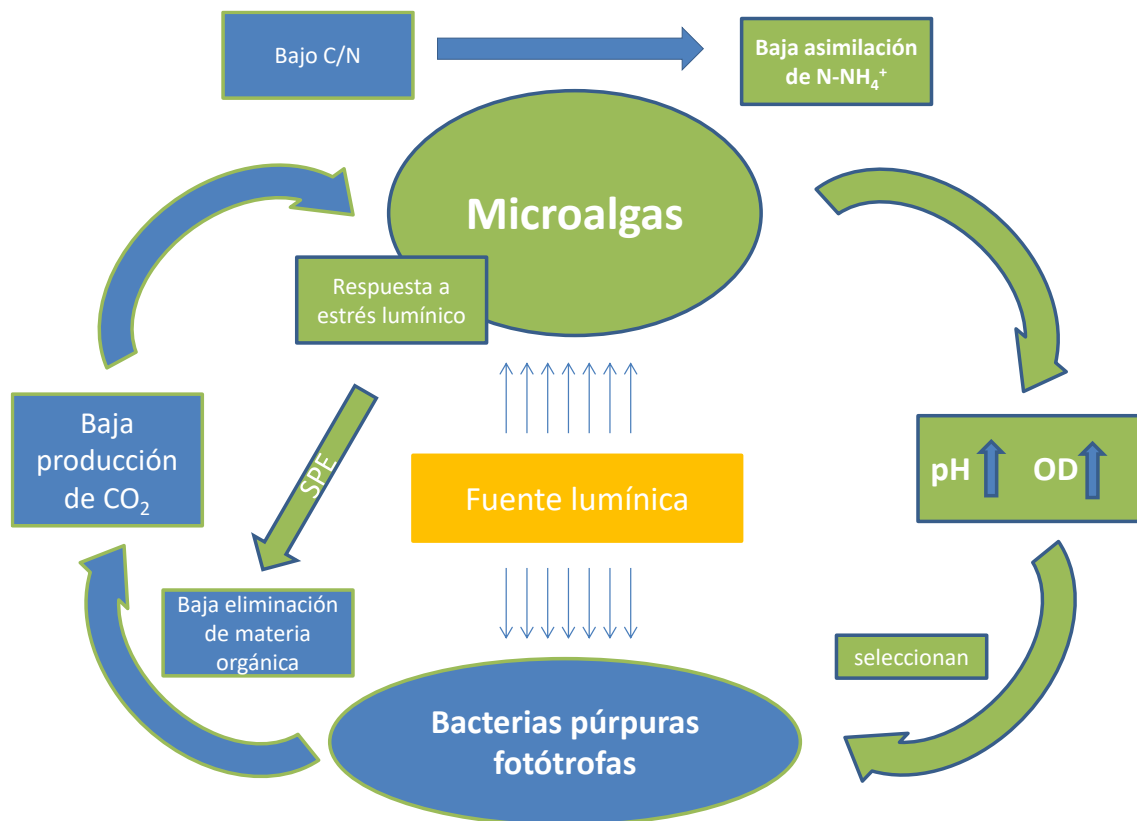


Figura 4.23. Esquema de las relaciones entre las microalgas y las bacterias fotoorganotrofas encontradas en los FBRs operados con TRH de 3 días.

4.4. Caracterización de la actividad microbiana mediante balances de oxígeno.

Durante la experimentación en semi-continuo se detectaron variaciones en la concentración de OD como consecuencia de la interacción entre metabolismos autótrofos y heterótrofos. Estas fluctuaciones se debieron al balance entre producción y consumo de oxígeno (Ecuación 3.9, Pág. 76).

El consumo de oxígeno por las bacterias heterótrofas ha sido ampliamente descrito en sistemas de fangos activos [13]. De acuerdo con los modelos establecidos, la velocidad de consumo de oxígeno es proporcional a la concentración de microorganismos y sustratos asimilables (materia orgánica principalmente), de acuerdo con la Ecuación 3.11 (Pág. 79). La producción de oxígeno por las microalgas, en cambio, es función principalmente del flujo de fotones en rango visible que reciben los cultivos (Ecuación 2.2, Pág. 45). Por ello, los ensayos en

continuo realizados en los FBRs cerrados, se utilizaron para realizar una caracterización de la actividad biológica mediante un cálculo de balance de oxígeno en el reactor.

El cálculo de las tasas de actividad de los microorganismos que forman el consorcio puede realizarse mediante la aplicación de modelos que simulen el proceso. El desarrollo y la implementación de modelos capaces de explicar las interacciones entre la intensidad lumínica que recibe el cultivo y la producción de oxígeno pueden suponer un avance significativo en el conocimiento de los procesos de depuración. De esta manera es posible contribuir a mejorar el diseño y la implementación de estos sistemas de tratamiento de aguas a escala industrial.

4.4.1. Evolución en la concentración de oxígeno disuelto (OD)

La fluctuación del OD registrado durante la operación con TRH de 3 días aparece reflejada en la Figura 4.24. Estas fluctuaciones se detectaron durante todo el período experimental, a modo de ejemplo, se muestran las fluctuaciones de dos días consecutivos representativos del cultivo (12 y 13). Se seleccionaron estos días debido a la estabilidad en términos de composición de nutrientes que presentó el influente, lote 3 (Tabla 3.2, Pág. 67). Durante las primeras horas de la fase de iluminación, como consecuencia de la actividad fotosintética, la tasa de OD alcanzó velocidades de $5,3 \pm 0,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, lográndose una concentración de $18,8 \pm 1,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores como Arbib *et al.*, [136], en el tratamiento de agua residual urbana en *raceway* ($4,16 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) o los descritos por Costache *et al.*, [134], ($3,64 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y por Jeon *et al.*, [138], ($8,83 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en cultivos puros de microalgas.

Tras la alimentación de agua residual fresca, se observó una caída brusca de la tasa de producción de OD a $(-9,3 \pm 3,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1})$, hasta alcanzar una concentración de $14,3\text{-}15,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, durante un breve estado estacionario. Esta significativa disminución en la concentración de OD se debió al aumento en la materia orgánica dentro del FBR como consecuencia de la alimentación de agua residual fresca ($406,5 \pm 30,4 \text{ mg DQO}_T \text{ L}^{-1}$ y $215,5 \pm 33,2 \text{ mg DQO}_S \text{ L}^{-1}$). La adición de nueva materia orgánica generó su consumo casi inmediato por parte de los microorganismos encargados de su oxidación. Cabe destacar que a pesar de que los resultados de DGGE y CF señalasen la escasez de microorganismos puramente heterótrofos característicos de los fangos activos, las bacterias púrpuras fotótrofas pueden consumir componentes orgánicos de pequeño peso molecular fácilmente biodegradables de los influentes (AGVs como el acetato [82, 84, 85]). El consumo de estos componentes de las aguas generó la caída de la concentración de OD. Aproximadamente tres horas después de la alimentación con agua

residual, la tasa de OD aumentó a una velocidad de $6,2 \pm 1,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ hasta alcanzar una concentración máxima de $37,1 \pm 0,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ al final del período de iluminación. Este máximo de concentración de OD se explica porque una vez agotada la DQO biodegradable cesa el consumo de oxígeno, mientras que las microalgas continúan su actividad fotosintética. Durante la fase de oscuridad del ciclo diario la concentración de OD decreció rápidamente durante las primeras horas del período a una velocidad de $-16,0 \pm 0,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, alcanzándose una concentración mínima de OD de $1,4 \pm 0,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ después de 7 horas de oscuridad.

El consumo metabólico interno de las microalgas puede explicar estos resultados. Algunos autores mencionan que, durante los períodos nocturnos, las microalgas pueden perder gran parte de su peso ganado durante el día, reduciendo su carga en materiales de reserva y consumiendo oxígeno [128, 260].

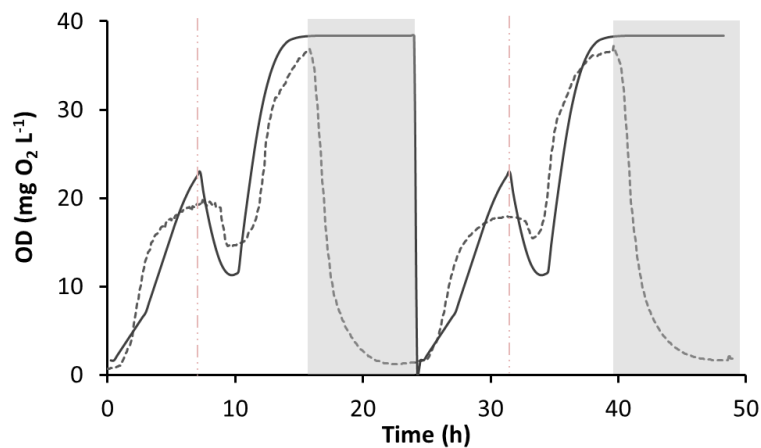


Figura 4.24. Evolución del OD durante dos días consecutivos (12-13) de operación con TRH de 3 d. La concentración determinada experimentalmente se representa con línea discontinua (---) y la modelada con línea continua (—). Los períodos de alimentación se reflejan con la línea discontinua vertical roja (—). La duración del período iluminación se representa en fondo blanco □ y los períodos oscuros en fondo gris ■.

4.4.2. Caracterización de la actividad biológica de microalgas

Las fluctuaciones de la concentración de oxígeno disuelto se deben a la producción, por parte de las microalgas y al consumo, por parte del metabolismo heterótrofo, tanto de las microalgas como de las bacterias. A pesar de que tanto microalgas como bacterias presentan metabolismo heterótrofo, ésta últimas tienen una mayor velocidad de crecimiento bajo este metabolismo [261, 262]. Por lo tanto, en presencia de materia orgánica biodegradable el

desarrollo de las bacterias estará favorecido y consumiendo la mayor parte del oxígeno en este proceso (Tabla 2.5, Pág. 41). De esta manera, el consumo de oxígeno depende de la disponibilidad de materia orgánica. Por el contrario, la producción de oxígeno depende de la intensidad lumínica que recibe el cultivo. La velocidad con que las microalgas producen oxígeno depende de parámetros cinéticos característicos de cada especie. Para poder determinar y predecir dicha tasa de producción de oxígeno en los FBRs, dada por la Ecuación 2.2 (Pág. 45), fue necesario establecer los parámetros cinéticos específicos (RO_{2max} e I_k) de la especie empleada (*C. Sorokiniana*). Para ello, se requirió definir las tasas de oxigenación de las microalgas a diferentes intensidades lumínicas. Con este propósito, se realizó un ensayo de respuesta a intensidad lumínica usando el sistema experimental mostrado en la Figura 3.4 (Pág. 78). De esta manera, es posible obtener dichos parámetros cinéticos: tasa de producción máxima (RO_{2max}) y valor de la constante media de saturación para intensidad lumínica (I_k) (Figura 4.25). Dado que se detectó una cinética de inhibición a alta intensidad lumínica, también se determinó la intensidad de inhibición (I_i). Las distintas intensidades ensayadas fueron promediadas dentro del FBR empleando I_{av} (Ecuación 2.3, Pág. 46) [122].

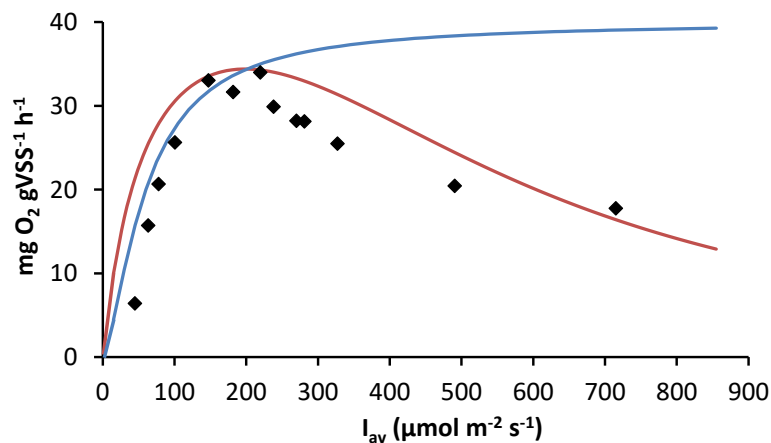


Figura 4.25. Influencia de la intensidad lumínica en la velocidad de producción de oxígeno de la biomasa de microalgas-bacterias. Los rombos (♦) representan la RO_2 a diferentes intensidades lumínicas testadas. La línea roja (—) representa los valores modelizados con el efecto de inhibición y en línea azul (—) los valores modelizados de la velocidad de producción sin el efecto de la foto-inhibición.

Por lo tanto, como puede observarse en la Figura 4.25, a intensidades lumínicas inferiores a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la velocidad de oxigenación del consorcio microalgas-bacterias aumentó proporcionalmente con el incremento de la intensidad lumínica, presentando una velocidad de producción de oxígeno máxima de $7,0 \pm 0,6 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, equivalente a $31,9 \pm 1,2 \text{ mg O}_2 \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (en un cultivo con una concentración de $0,22 \text{ g SSV L}^{-1}$). Este aumento de la velocidad de oxigenación indica que este rango de iluminación corresponde a las condiciones de foto-limitación.

El sistema se foto-saturó a intensidades comprendidas entre 150 y $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir de este valor, la velocidad de oxigenación fue disminuyendo debido a procesos de foto-inhibición. Las menores velocidades de producción de oxígeno se obtuvieron a intensidades lumínicas superiores a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alcanzando el valor de $18 \text{ mg O}_2 \text{ g VSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Los valores para el mejor ajuste de la Ecuación 2.2 (Pág. 45) fueron de $7,0 \pm 0,6 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para $RO_{2_{\max}}$, 60 para I_k , y 2 para el parámetro formal n .

En términos de producción de oxígeno por unidad de biomasa (SSV), y en condiciones de intensidad lumínica óptimas, las velocidades de producción de oxígeno por peso de biomasa en este ensayo ($31,9 \pm 1,2 \text{ mg O}_2 \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fueron considerablemente inferiores a las obtenidas en otros estudios similares. Estas diferencias se pueden explicar debido a los distintos diseños experimentales que consisten en el uso de medios de cultivo sintéticos y el uso de cepas de microalgas comerciales. Estas diferencias dificultan la comparación estricta con ensayos de otros autores. Por ejemplo, Costache *et al.* [134] obtuvieron valores de $88 \text{ mg O}_2 \text{ g peso seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando una cepa del género *Scenedesmus* cultivada en un medio sintético. Cabe destacar que, en este estudio, además la cuantificación de la biomasa del consorcio se realizó en términos de SSV frente al de Costache *et al.* En el que se expresaron en términos de peso seco (ST). Además, en el presente trabajo, parte de estos SSV estaban compuestos por bacterias fotótrofas púrpuras (familia *Rhodobacteraceae*), restos celulares y sólidos suspendidos del propio influente. Estos elementos pueden explicar los valores relativamente bajos encontrados en este ensayo.

A la vista del análisis realizado, la cantidad de oxígeno producido por las microalgas puede ser afectada por muchos factores, siendo la más importante la intensidad lumínica. La curva de respuesta lumínica obtenida a partir del consorcio de microalgas-bacterias mostró un nivel de oxigenación máximo a intensidades de 200 - $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y comienza a disminuir a partir de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos análisis revelan la baja tolerancia a altos niveles de radiación de la cepa de *C. sorokiniana* empleada en este ensayo (aislada previamente del decantador primario de una EDAR) en comparación con cepas comerciales. En este sentido, Costache *et al.* detectaron

foto-inhibiciones a intensidades lumínicas superiores a los $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ empleando la especie *Scenedesmus almeriensis* [134]. Por el contrario, Jeon *et al.* determinaron que la especie de microalga verde *Haematococcus pluvialis* no estaba inhibida a intensidades superiores a $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [138]. Por lo tanto, se puede concluir que el fenómeno de foto-inhibición es un fenómeno que puede ocurrir a distintas intensidades lumínicas dependiendo de la cepa de microalga.

Para poder caracterizar el consorcio y predecir el efecto de la foto-inhibición y modelizarlo en función a los resultados obtenidos en la curva de respuesta lumínica, fue necesario introducir en el análisis un parámetro de inhibición (I_i). Más concretamente, este fenómeno se incluyó a través de la Ecuación 2.5 (Pág. 47). Para ello, los parámetros formales n y m se determinaron por ajuste de mínimos cuadrados, asignándoles los valores $n = 2$ y $m = 3$ (Figura 4.25). El trabajo publicado por el profesor Aiba (1982) corrobora que asignando valores de 1 para n y 2 para m , también es posible obtener un ajuste preciso, resultando en una expresión de inhibición por sustrato de tipo Haldane [126].

Cabe mencionar que la foto-inhibición es un fenómeno complejo que no solo depende de la tolerancia de la cepa de microalga empleada sino que también depende de la adaptación previa de las microalgas a una determinada radiación lumínica [263]. En este sentido, las intensidades lumínicas medias (I_{av}) en los FBRs destinados al tratamiento de aguas (Figura 3.2, Pág. 69) fueron significativamente menores a los niveles en los que se detectó foto-inhibición (74 vs. $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por lo tanto, no fue necesario aplicar la ecuación de la inhibición (Ecuación 2.5, Pág. 47) para la simulación de la producción de oxígeno durante el tratamiento en semi-continuo. A pesar de esto, en sistemas de producción abiertos al ambiente y situados en el exterior, dependiendo de la localización y configuración del FBR, los niveles de I_{av} pueden estar entre 100 y $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [264]. Por todo esto, es recomendable emplear modelos que incorporen la foto-inhibición en las simulaciones de oxigenación y de crecimiento fotosintético de microalgas.

4.4.3. Modelización de la acumulación de oxígeno

El siguiente paso para poder predecir la acumulación del OD durante la operación del FBR fue aplicar los valores obtenidos a partir de los ensayos de respuesta lumínica, (RO_{2max} , I_k , y n , Pág. 45) en la Ecuación 2.2 (Figura 4.25). Posteriormente se incluyeron los valores de consumo de oxígeno por los microorganismos heterótrofos a través de la Ecuación 3.11, (Pág. 79). Con los

valores necesarios, tanto para establecer el consumo como para la acumulación, fue posible cerrar el balance de oxígeno descrito por la Ecuación 3.9 (Pág. 76). Los resultados obtenidos del modelo se ajustaron razonablemente con los datos experimentales obtenidos durante el período de iluminación (Figura 4.24). Más concretamente, las tendencias y los valores máximos obtenidos mediante el modelo se aproximan razonablemente a los recogidos experimentalmente. Las velocidades de producción y consumo modelizadas encajan con las experimentales. La reducción del OD, debido al consumo bacteriano, está de acuerdo con las ecuaciones propuestas para heterótrofos aerobios. Las tasas de producción de O_2 en ausencia de materia orgánica biodegradable y en presencia de concentraciones de sobresaturación de O_2 también son predichas por el modelo. Las diferencias registradas entre el modelo y los valores empíricos pueden deberse al efecto *buffer* que genera el aire en el espacio disponible en la parte superior del reactor.

El valor de acumulación de OD obtenido en el modelo durante el comienzo del ciclo de iluminación (previo a la incorporación del influente) fue de $4,4 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ligeramente inferior al determinado experimentalmente: $5,3 \pm 0,5 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.24). Como consecuencia de la oxidación de la materia orgánica que se produjo tras la alimentación del FBR con agua residual fresca, se produce una rápida velocidad de la caída de la concentración de OD. En este caso el valor obtenido por el modelo, fue del mismo modo, levemente inferior al experimental: $-6,8 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ frente a $-9,3 \pm 3,2 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Transcurridas tres horas desde la alimentación, se detectó un aumento progresivo de la concentración de OD (metabolismo autótrofo), tanto en los valores experimentales como los obtenidos en el modelo.

Al final del período de iluminación se observó un efecto de inhibición por producto (O_2) (Figura 4.24). Por ello, en el modelo se integró un factor de corrección, incorporando los valores cinéticos determinados experimentalmente ($KO_2 = 31 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ y la $z = 2,3$, Ecuación 2.8, Pág. 50). Con estos parámetros fue posible simular la disminución en la velocidad de oxigenación debido a las elevadas concentraciones de OD.

En la Figura 4.26 se muestran los valores de concentración de OD obtenidos en la simulación de los diferentes bioprocesos que tienen lugar durante el proceso de depuración: producción fotosintética de oxígeno (con y sin inhibición por producto) y consumo bacteriano.

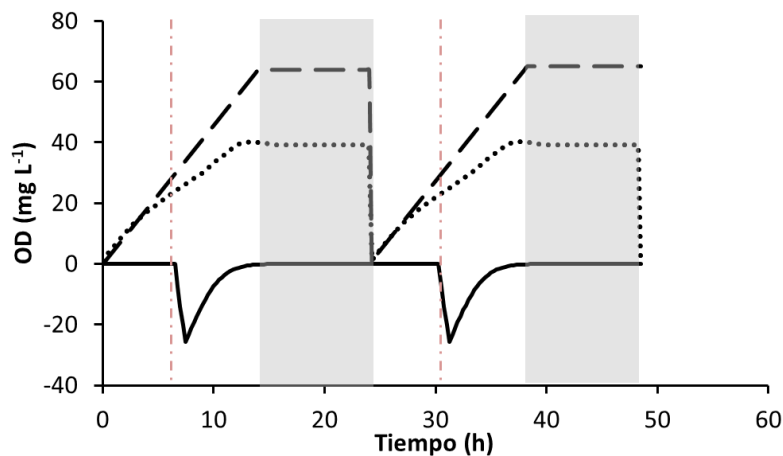


Figura 4.26. Valores simulados de la evolución de OD considerando cada uno de los bioprocesos: producción sin inhibición por oxígeno (— —), producción con inhibición (••) y consumo por microorganismos heterótrofos (—). La duración del período iluminación se refleja en fondo blanco y los períodos oscuros en fondo gris . Los períodos de alimentación se reflejan con la línea discontinua vertical roja (—).

Como puede observarse en la Figura 4.26, a partir de los valores de concentración de OD, el modelo permite identificar los diferentes procesos que se producen en el tratamiento de aguas (oxigenación fotosintética, consumo heterótrofo e inhibición por producto). Sin embargo, este modelo, debido a que solo tiene en cuenta la oxigenación fotosintética y el consumo heterótrofo de la DQO del influente, no es capaz de predecir la caída de la concentración de OD durante el período de oscuridad (Figura 4.24 y Figura 4.26). La disminución del OD causado por el consumo endógeno de las reservas energéticas de las microalgas durante el período nocturno no puede simularse. Por lo tanto, durante la fase oscura el modelo mantiene los valores de OD máximos alcanzados durante la fase lumínica.

Por encima de la concentración inhibitoria de OD ($31 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) el modelo es capaz de predecir satisfactoriamente la disminución en la velocidad de producción de oxígeno que se produce experimentalmente. Este hecho es relevante ya que se ha demostrado que deben evitarse concentraciones superiores al 250% de saturación de OD ($20 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) para no afectar el desarrollo de las microalgas [64].

Durante las últimas horas del período de iluminación, la sobresaturación de oxígeno se convirtió en el principal factor desencadenante de la fotorrespiración.

Esta disminución puede atribuirse a interferencias que elevadas concentraciones de oxígeno pueden tener en la cadena de transporte de electrones o al desacoplamiento del PSII (centro catalítico encargado de la fotólisis del agua y liberación del O_2), por la formación de especies reactivas de oxígeno [265, 266]. En condiciones que favorecen la fotorrespiración las microalgas no solo consumirían las reservas energéticas de ATP y poder reductor ($NADPH+H^+$), sino que además se estaría derivando C y N fijado previamente en forma de biomasa a CO_2 y NH_4^+ [267, 268].

Hay que destacar que el efecto inhibitorio del oxígeno raramente ha sido incluido en la modelización de los FBRs.

4.5. Semi-continuo, caracterización de los consorcios vía análisis masivo de ADN y modificación de condiciones

Dado que en los ensayos anteriores la composición microbiana del consorcio tuvo un efecto significativo sobre los rendimientos de depuración, en este experimento se repitieron las mismas condiciones, pero se realizó el seguimiento más exhaustivo de las poblaciones microbianas. La finalidad de este experimento fue:

1. Caracterizar las poblaciones a través del análisis masivo de ADN. Este tipo de análisis presenta ventajas frente a la técnica de DGGE en la que únicamente se pueden detectar con precisión las bandas de mayor intensidad ya que, las de menor intensidad llevan implícito dificultades para su identificación y corte del gel, puesto que permite cuantificar hasta las poblaciones más minoritarias.
2. Evaluar el efecto de la saturación de gases fruto de la operación con FBRs cerrados a la atmósfera en el tratamiento de aguas y en el desarrollo de los consorcios. En el ensayo previo (TRH de 3 d) el método de operación cerrado, necesario para el estudio de las relaciones metabólicas (O_2), resultó ser determinante en la selección de un consorcio formado por *C. sorokiniana* y bacterias de la familia *Rhodobacteraceae*. Dicho consorcio tuvo una repercusión negativa en los parámetros de eliminación de materia orgánica.

Los inóculos empleados en este ensayo difirieron ligeramente con respecto a los ensayos previos. Las microalgas empleadas como inóculo pertenecieron igualmente a la especie *C. sorokiniana*. En cambio, para el inóculo bacteriano se empleó fango activo de un lote recolectado inmediatamente antes de la experimentación (lote 2 vs. lote 1). Durante los últimos

12 días de operación uno de los duplicados fue destapado para evaluar el efecto de la sobresaturación de gases (O_2 y NH_3) sobre la depuración de aguas residuales y sobre la selección de consorcios. En este caso, se utilizó el lote 4 de agua (Tabla 3.2, Pág. 67), recolectado en un solo período para evitar las variaciones diarias de la composición del influente y se almacenó congelada para preservar sus características.

4.5.1. Estudio de la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y materia orgánica (DQO)

La operación durante el tratamiento se dividió en dos fases. La primera fase (Fase 1) duró 42 días y el régimen de alimentación fue diurno. Los FBRs fueron operados de manera cerrada (aislados de la atmósfera) (Figura 4.27). La segunda fase (Fase 2), tras 42 días de operación, se prolongó durante 12 días. Debido a la escasa eliminación de nitrógeno durante la Fase 1 se procedió a cambiar el método de operación (Fase 2). En la Fase 2, uno de los fotobiorreactores (FBR B) se abrió para poder analizar el efecto de la volatilización del NH_3 y el O_2 (Figura 4.27). La menor duración de la Fase 2 con respecto a la Fase 1 se debió a la escasez de influente del lote 4. La operación en la Fase 2 no se prolongó para evitar el uso de un influente distinto al empleado en la Fase 1, hecho que dificultaría la comparación. Sin embargo cabe destacar que en ambas fases se operó el reactor con un mínimo de 4 TRH para garantizar la estabilidad del sistema. En esta segunda fase se cambió el régimen horario de alimentación, y pasó a alimentarse los FBRs durante el período de oscuridad. Este cambio se realizó con la finalidad de mejorar los parámetros de eliminación del NT favoreciendo el proceso de nitrificación-desnitrificación, basándose en diseños experimentales previos [155].

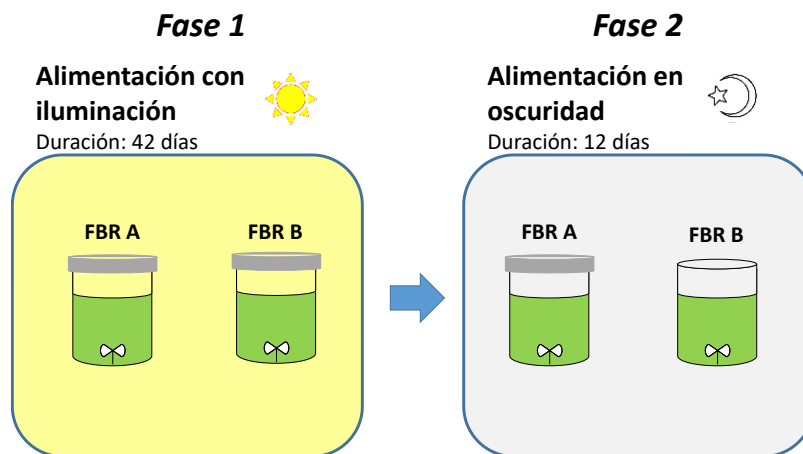


Figura 4.27. Esquema de la operación con TRH de 3 d, dividida en: Fase 1 y Fase 2.

Tratamiento de agua: Fase 1

Eliminación de Materia orgánica: DQO₅

La concentración de materia orgánica en el efluente durante los 42 primeros días de operación en semi-continuo fue relativamente constante, alcanzando valores medios diarios de $122,7 \pm 19,9$ mg DQO₅ L⁻¹ (Figura 4.28.A). Esta concentración se encuentra dentro del límite de descarga legal para zonas sensibles (<125 mg DQO₅ L⁻¹) y supone un porcentaje de eliminación del $45,6 \pm 8,4\%$ frente al contenido inicial (Tabla 4.7). Estas eliminaciones parciales de DQO₅ son coherentes a los porcentajes de eliminación detectados por Méndez *et al.* (35-45%) operando FBRs cilíndricos de 1 L y con el mismo TRH [228].

Para cuantificar la fracción biodegradable del agua residual empleada (lote 4), se realizó un ensayo de biodegradabilidad empleando como inóculo el mismo fango activo usado como inóculo de los FBRs (Figura 4.28).

En el test de biodegradabilidad se determinó que la fracción no biodegradable de DQO₅ en este influente era de 100 ± 0 mg DQO₅ L⁻¹. Más concretamente, este valor supone un 55,8% de la DQO₅ total, similar a los valores reportados para aguas urbanas [13]. Considerando el valor de DQO₅ biodegradable, la eliminación obtenida en los FBRs fue del $87,5 \pm 7,5\%$, coincidiendo con los elevados porcentajes de eliminaciones $>80\%$ encontrados en estudios realizados en *raceway* y sistemas experimentales de laboratorio [61, 120, 155, 221].

Las diferencias con respecto a los influentes dificulta la comparación estricta entre los ensayos en los que se emplearon los lotes 3 y 4 de aguas residuales. Sin embargo, el mayor porcentaje de eliminación de la fracción biodegradable de la DQO₅ en estos experimentos frente a los obtenidos en los ensayos anteriores puede deberse a diferencias en la fracción soluble o a diferentes consorcios. Dado que la composición de las aguas empleadas presentaban similares porcentajes de DQO₅ biodegradable (60,7 y 55,8 para los lotes 3 y 4, respectivamente), las diferencias obtenidas podrían atribuirse a las poblaciones procariotas desarrolladas en el consorcio de ambos experimentos. La caracterización de los consorcios a través del análisis masivo de ADN puede contribuir a caracterizar las poblaciones responsables de la eliminación de DQO.

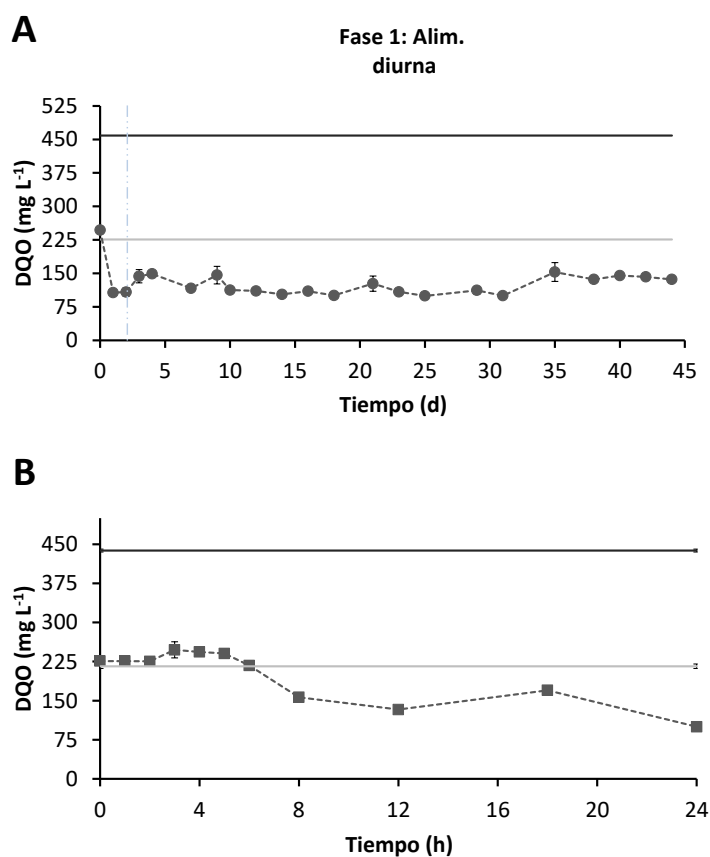


Figura 4.28. A) Evolución de la DQO durante la operación con TRH de 3 d (Fase 1). B) Test de biodegradabilidad. Las líneas continuas representan la concentración de DQO en el influente: DQO_T (—) y DQO_S (—). La línea discontinua (— —) representa la concentración de DQO_S en el efluente. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Tabla 4.7. Concentración de DQO_S en los influentes, los efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y TRH de 3 d (Fase 1).

Eliminación de materia orgánica	TRH 6 d	TRH 3 d	TRH 3 d (Fase 1)
Concentración influente (mg DQO _S L ⁻¹)	240,0 ± 5,3	290,2 ± 123,0	226,0 ± 27,7
Concentración Biodegradable influente (mg DQO _S L ⁻¹)	-	176,2 ± 8,5	126,0 ± 27,7
Concentración efluente (mg DQO _S L ⁻¹)	168,7 ± 25,5	177,2 ± 28,3	122,7 ± 19,7
Porcentaje de eliminación	29,7 ± 10,6	35,5 ± 10,3	45,6 ± 8,4
Porcentaje eliminación Biodegradable	-	64,2 ± 4,8	87,5 ± 7,5

Eliminación de Nitrógeno: NT

La única forma en la que se encontró el N en los FBRs fue en $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NH}_3$, sin detectar NO_2^- ni NO_3^- . Durante la Fase 1, la concentración de N-NH_4^+ en los FBRs se mantuvo relativamente estable durante los 42 días de operación, con una concentración media de $31,8 \pm 1,5 \text{ mg NT L}^{-1}$, lo que significa una velocidad de eliminación diaria de $5,8 \pm 1,0 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figura 4.29).

El porcentaje de eliminación de nitrógeno total fue del $35,4 \pm 3,1\%$. Esta baja eliminación de nitrógeno se debió a que el principal mecanismo de eliminación fue la asimilación por parte de la biomasa. En este sentido, de Godos *et al.*, en su trabajo de tratamiento de purines de cerdo diluidos realizados en semi continuo (TRH de 4,4 d), encontraron eliminaciones parciales de N-NH_4^+ similares a las del presente ensayo (37 vs. 35%) [218]. En el estudio previamente citado, Beydeş y Karapinar, empleando agua residual sintética y un TRH de 3 d, encontraron eliminaciones en términos de masa también similares $3,6\text{-}7,1$ vs. $5,1\text{-}7,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ [225].

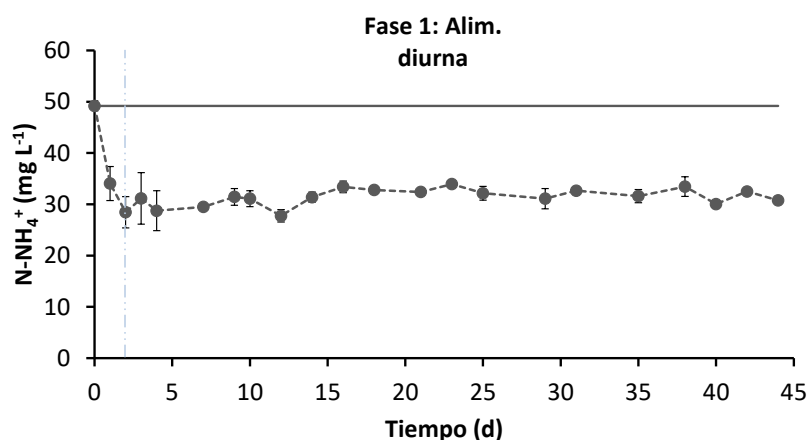


Figura 4.29. Evolución del N-NH_4^+ durante la operación en semi-continuo TRH de 3 días (Fase 1). La línea continua (—) representa la concentración de N-NH_4^+ en el influente y la línea discontinua (---) la concentración del efluente. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Tabla 4.8. Comparativa entre las concentraciones de N-NH_4^+ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y TRH de 3 d (Fase 1).

Eliminación de nitrógeno	TRH 6 d	TRH 3 d	TRH 3 d (Fase 1)
Concentración influente (mg $\text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	62,3 \pm 2,3	36,2 \pm 18,2	49,2 \pm 3,6
Concentración efluente (mg $\text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	34,0 \pm 7,8	10,0 \pm 7,7	31,8 \pm 1,5
Porcentaje en biomasa	45,7 \pm 6,5	54,5 \pm 21,2	29,8 \pm 2,9
Porcentaje en pérdidas (volatilización)	11,2 \pm 9,7	16,9 \pm 12,1	5,7 \pm 3,9
Porcentaje de eliminación	56,9 \pm 10,1	71,4 \pm 20,3	35,4 \pm 3,1

Considerando un contenido de N en la biomasa del 5%, la eliminación del nitrógeno en forma de biomasa representó un $29,8 \pm 2,9\%$ del total del contenido en el influente (Figura 4.30.A). Las pérdidas de nitrógeno causadas por volatilización representaron escasamente un $5,7 \pm 3,9\%$.

Debido a las distintas y cambiantes aguas residuales empeladas no es posible realizar una comparación estricta de los resultados de los ensayos realizados por lo que tampoco se puede obtener una conclusión clara de que régimen hidráulico fue el más adecuado para la eliminación de nitrógeno. En cambio, si es posible determinar que la operación cerrada a la atmósfera no permite una completa eliminación del nitrógeno. Por lo tanto, los porcentajes de eliminación encontrados son significativamente inferiores a los obtenidos en estudios en FBR abiertos y fueron insuficientes para cumplir la normativa más restrictiva de vertido de aguas residuales ($<15 \text{ mg NT L}^{-1}$, Tabla 2.3, Pág. 13) [61, 120, 220, 227].

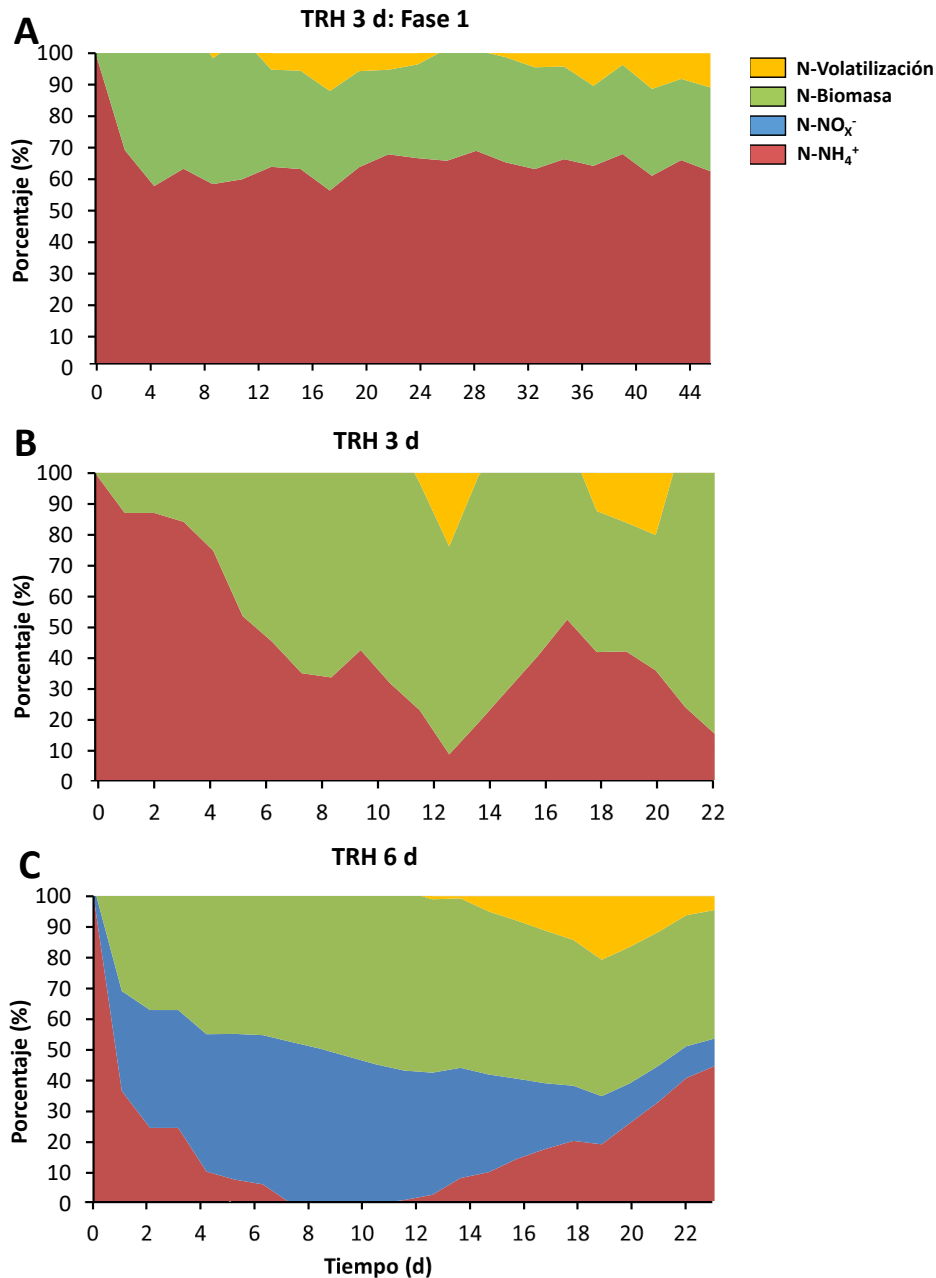


Figura 4.30. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno (%) durante la operación en semi-continuo con TRH de 3 d-Fase 1 (A), TRH de 3 d (B) y TRH de 6 d (C).

Evolución de la biomasa: sólidos suspendidos volátiles

Al igual que en los casos anteriores, los microorganismos del consorcio se desarrollaron durante las primeras 48 h del *batch* (Figura 4.31). Una vez comenzado el régimen semi-continuo, la concentración (medida como SSV) decreció paulatinamente hasta alcanzar, a partir del día 10, un valor medio de $0,30 \pm 0,03$ g SSV L^{-1} . Como ocurría en los experimentos anteriores, al aplicar un TRH de 3 d, durante los primeros diez días el cultivo sufre una disminución en la

concentración de SSV. A partir del día diez, la concentración se estabiliza en torno a $0,30 \text{ g SSV L}^{-1}$. Estos valores están en el rango de los obtenidos por otros autores empleando TRH similares ($0,150\text{-}0,450 \text{ g L}^{-1}$) [58, 218, 228, 231].

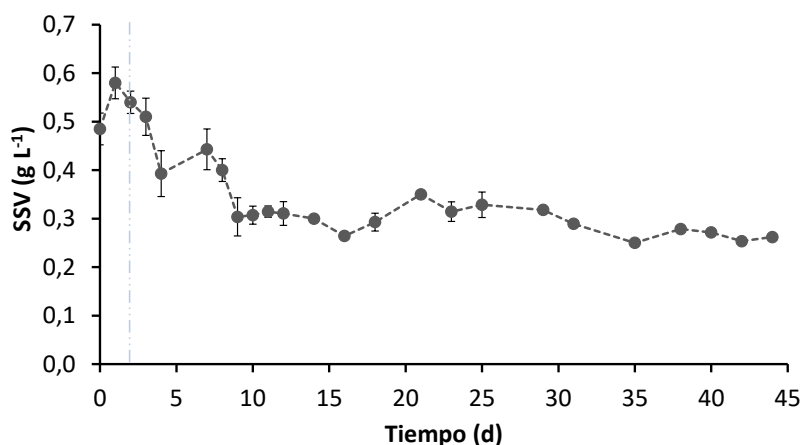


Figura 4.31. Evolución de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) durante la operación con TRH de 3 d (Fase 1). La línea discontinua (—) representa la concentración en el efluente. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Evolución de pH y carbono inorgánico (CI)

Los valores de pH se determinaron de manera puntual entre las 9:00 y 11:00 h (Figura 4.32), coincidiendo con el comienzo del ciclo de iluminación. La evolución del pH a lo largo del proceso de depuración permite caracterizar las formas en las que se encuentra el C en medios líquidos a través del cálculo de la alcalinidad parcial (Apartado 3.1.4, Pág. 74). El valor medio del pH en los FBRs fue $10,0 \pm 0,3$, lo que conlleva una concentración media de HCO_3^- de $34,9 \pm 11,6 \text{ mg L}^{-1}$. Dicha concentración no supuso una dificultad para el desarrollo de las microalgas ya que el límite para la inhibición de su crecimiento se encuentra entre $1\text{-}2 \text{ mg HCO}_3^- \text{ L}^{-1}$ [232].

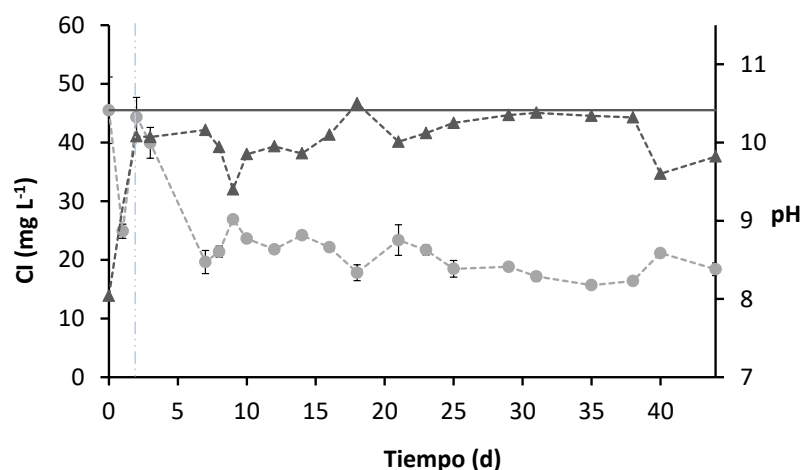


Figura 4.32. Evolución de la concentración de Cl (●) y del pH (▲) durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1. La línea continua (—) representa la concentración de Cl del influente y las líneas discontinuas (— —) los valores de los efluentes. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Evolución de la concentración de OD

Del mismo modo que en el ensayo previo de TRH de 3 d, como consecuencia de los ciclos de iluminación/oscuridad y la operación en semi-continuo, la concentración del OD sufrió fluctuaciones diarias (días de operación 22 y 23, Figura 4.33). Durante las primeras 5 horas de la fase de iluminación, la velocidad de producción de OD fue de $5,7 \pm 0,4 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (velocidad similar a la alcanzada en el experimento anterior) (Figura 4.33.B, $5,3 \pm 0,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y a la encontrada por otros autores (Arbib *et al.* [136], Costache *et al.* [134] y Jeon *et al.* [138]).

La concentración máxima de OD alcanzada en este período ($17,1 \pm 0,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) también fue similar a la del experimento anterior ($18,2 \pm 3,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, Figura 4.33). Esta acumulación se debió al metabolismo fotosintético de las microalgas y a la falta de consumo del oxígeno generado por los microorganismos heterótrofos debido a la escasez de sustrato disponible (materia orgánica, DQO) para su metabolismo.

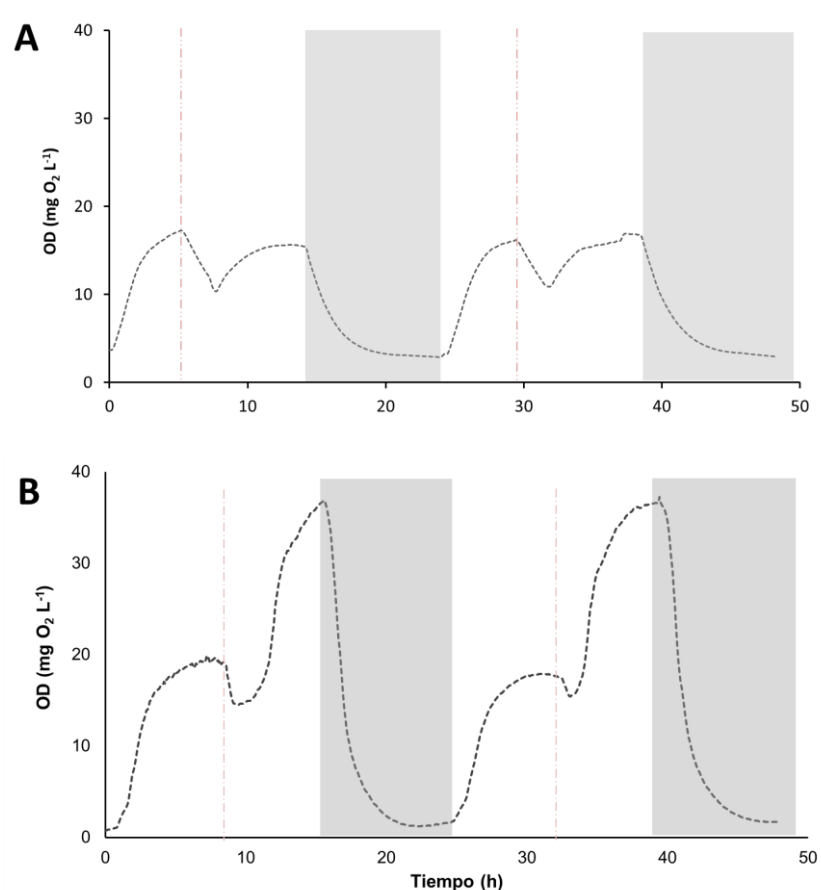


Figura 4.33. Evolución del OD durante dos días consecutivos de cultivo operados con TRH de 3 d. A) Datos procedentes de la Fase 1. B) Datos procedentes de los experimentos previos con el mismo TRH. Los períodos de alimentación se reflejan con la línea discontinua vertical (-). La duración del período iluminación en fondo blanco (□) y los períodos oscuros en fondo gris (■).

Las horas posteriores a la alimentación del FBR con nuevo influente (nuevo aporte de materia orgánica) ($458,8 \pm 25,2 \text{ mg DQO}_T \text{ L}^{-1}$ y $226,0 \pm 27,7 \text{ mg DQO}_5 \text{ L}^{-1}$), desencadenó una bajada muy acusada del OD. Esto indica consumo de oxígeno debido a la actividad heterótrofa. La tasa de consumo de oxígeno máxima fue de $-3,0 \pm 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, alcanzando una concentración mínima de $10,8 \pm 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.

Cabe destacar que, tanto la concentración como la velocidad de consumo, fueron diferentes a los encontrados en el ensayo previo ($-9,3 \pm 3,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $14,9 \pm 0,8 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, respectivamente). Es preciso mencionar que la comparación entre ambos experimentos resulta difícil debido a las cambiantes concentraciones de las aguas residuales del lote 3 frente a la del lote 4. Una vez alcanzada la concentración mínima posterior a la alimentación, y como consecuencia del agotamiento de la DQO fácilmente biodegradable, la concentración de OD

comenzó a aumentar nuevamente. El aumento de la velocidad que se produjo tras la alimentación, fue de $2,8 \pm 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, alcanzándose concentraciones de OD de $16,9 \pm 0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Estos resultados también difieren de los obtenidos en el experimento previo ($6,2 \pm 1,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $37,1 \pm 0,3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, respectivamente). Al finalizar el período de iluminación y comenzar el de oscuridad se observó una caída brusca del OD, pero menos acusado que en el experimento previo ($-5,6 \pm 0,5$ vs. $-16,0 \pm 0,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Durante el período de oscuridad la concentración de OD se estabilizó en $2,9 \pm 0,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Esta disminución nocturna se debió probablemente al consumo heterótrofo de reservas energéticas de los microorganismos que conllevaría un consumo del OD disponible en el medio [121, 256].

Las diferencias en las velocidades y concentraciones de OD, junto con las distintas eliminaciones de materia orgánica entre ambos ensayos, pueden deberse a las diferencias en la composición de las aguas o a una diferente composición de los consorcios de microalgas-bacterias. En sentido inverso, las menores concentraciones de OD registradas durante el presente experimento pudieron provocar la estabilización de un consorcio más adecuado para la eliminación de materia orgánica. Estas diferencias, tanto en la evolución del OD como en la eliminación de materia orgánica, hacen que el estudio de las poblaciones de microalgas-bacterias adquiera una mayor relevancia.

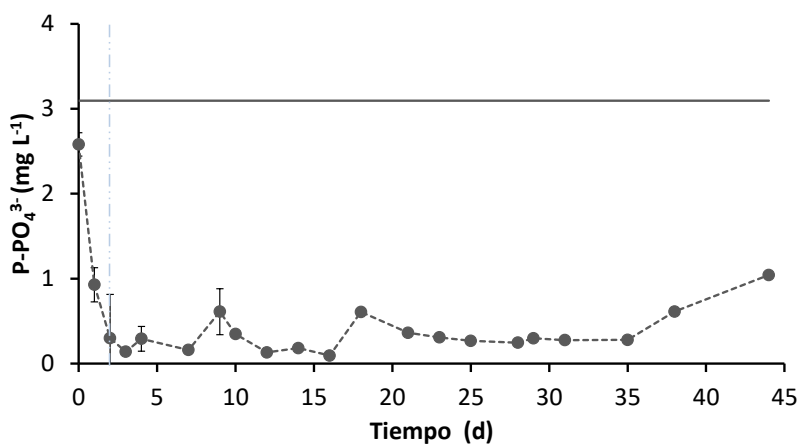
Eliminación de fosfatos, P-PO_4^{3-}

Los FBRs operados durante este ensayo mostraron una concentración de fósforo en los efluentes muy estable desde el comienzo de la operación ($0,4 \pm 0,2 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) (Figura 4.34). Cabe destacar que el contenido en P-PO_4^{3-} del agua residual del lote 4 fue bajo ($3,1 \pm 0,4 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$, Tabla 4.9) en comparación a los valores habituales en las aguas residuales urbanas ($4\text{-}15 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$, Tabla 2.2, Pág. 12). Teniendo en cuenta la concentración de P-PO_4^{3-} en los efluentes, la eliminación supuso un porcentaje del $88,8 \pm 7,4\%$ (Figura 4.34).

Tabla 4.9. Comparativa entre las concentraciones de P-PO_4^{3-} en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y TRH de 3 d (Fase 1).

Eliminación de fósforo	TRH 6 d	TRH 3 d	TRH 3 d (Fase 1)
Concentración influente (mg $\text{P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)	$13,1 \pm 1,7$	$4,9 \pm 3,6$	$3,1 \pm 0,4$
Concentración efluente (mg $\text{P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)	$1,6 \pm 2,2$	$1,1 \pm 0,8$	$0,4 \pm 0,2$
Porcentaje de eliminación (%)	$87,8 \pm 16,8$	$68,3 \pm 25,2$	$88,8 \pm 7,4$

Estos valores coinciden con las eliminaciones de otros autores que registraron porcentajes de eliminación de entre 80-95% [225]. Como ocurría en el ensayo anterior, la eliminación del fósforo pudo ocurrir tanto en forma de asimilación en biomasa como por precipitación a valores de pH elevados ($10,0 \pm 0,3$).

**Figura 4.34.** Eliminación del P-PO_4^{3-} durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1. La línea continua (—) representa la concentración de P-PO_4^{3-} del influente. La línea discontinua (---) representa la concentración en el efluente. La línea vertical azul (—) representa el final del período de adaptación en *batch*.

Tratamiento de agua: Fase 2, alimentación durante el período de oscuridad

En la Fase 2 la alimentación del agua residual fresca se realizó durante el periodo de oscuridad (Figura 4.27, Pág. 136). Con este cambio se pretendió fomentar la eliminación de N a través del proceso de nitrificación-desnitrificación. Esta decisión se basó en los resultados

obtenidos previamente por Foladori *et al.* [220]. En estos ensayos los autores consiguieron promover la desnitrificación generando un ambiente anóxico gracias a la alimentación nocturna.

Con el fin de analizar las posibles fluctuaciones diarias se realizaron las analíticas en tres momentos del ciclo: la primera y segunda muestras se tomaron a las 2 y 14 horas del comienzo del ciclo de iluminación. La tercera se recogió a las 22 horas del ciclo, correspondiente a las 8 horas de oscuridad. Como muestra la Figura 4.35, se asignó como comienzo del ciclo diario el inicio del período iluminación. Durante este experimento también se incluyó una nueva variable que consistía en operar el reactor A cerrado y el B abierto paralelamente (Figura 4.27, Pág. 136).

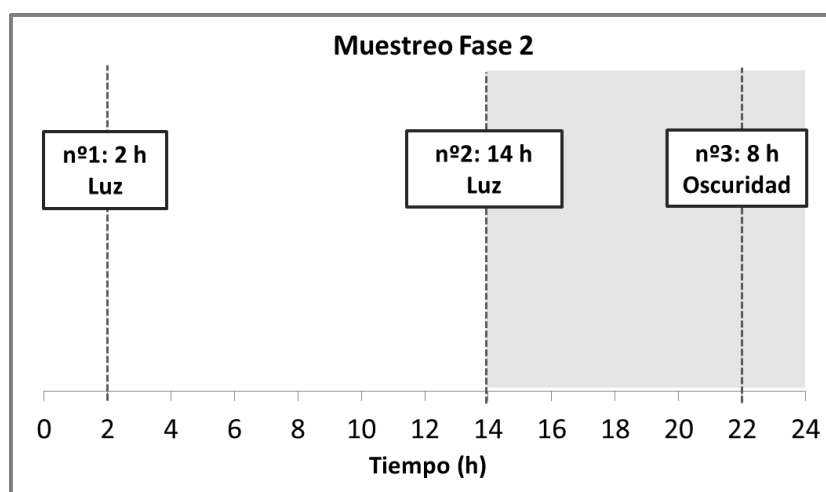


Figura 4.35. Esquema del muestreo durante la Fase 2 de operación de los FBRs.

Eliminación de materia orgánica

Con este cambio de operación se encontraron rendimientos de eliminación de DQO similares a los de la Fase 1, con una concentración media (FBR A y B) en el efluente de $117,8 \pm 7,9$ mg DQO₅ L⁻¹ y un porcentaje de eliminación del $47,9 \pm 3,5\%$ (Figura 4.36.A y Tabla 4.10). La concentración en el FBR A fue de $118,6 \pm 8,7$ mg DQO₅ L⁻¹ y la del FBR B $123,5 \pm 6,2$ mg DQO₅ L⁻¹.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido en materia orgánica entre las tres muestras diarias analizadas (Figura 4.36.B), mostrando que la descomposición de la materia orgánica ocurre durante las primeras horas posteriores a la adición del influente (Figura 4.33,

Pág. 144). Este hecho se puso en evidencia mediante la modelización de producción/consumo de oxígeno descrita en el Apartado 4.4.3 (Figura 4.26, Pág. 134).

Tabla 4.10. Comparativa entre las concentraciones de DQO₅ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación en los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y durante la Fase 1 y 2.

Eliminación de materia orgánica	TRH 6 d	TRH 3 d	TRH 3 d (Fase 1)	TRH 3 d (Fase 2)
Concentración influente (mg DQO ₅ L ⁻¹)	240,0 ± 5,3	290,2 ± 123,0	226,0 ± 27,7	226,0 ± 27,7
Concentración Biodegradable influente (mg DQO ₅ L ⁻¹)	-	176,2 ± 8,5	126,0 ± 27,7	126,0 ± 27,7
Concentración efluente (mg DQO ₅ L ⁻¹)	168,7 ± 25,5	177,2 ± 28,3	122,7 ± 19,7	117,8 ± 7,9
Porcentaje de eliminación	29,7 ± 10,6	35,5 ± 10,3	45,6 ± 8,4	47,9 ± 3,5
Porcentaje eliminación Biodegradable	-	64,2 ± 4,8	87,5 ± 7,5	85,9 ± 6,3

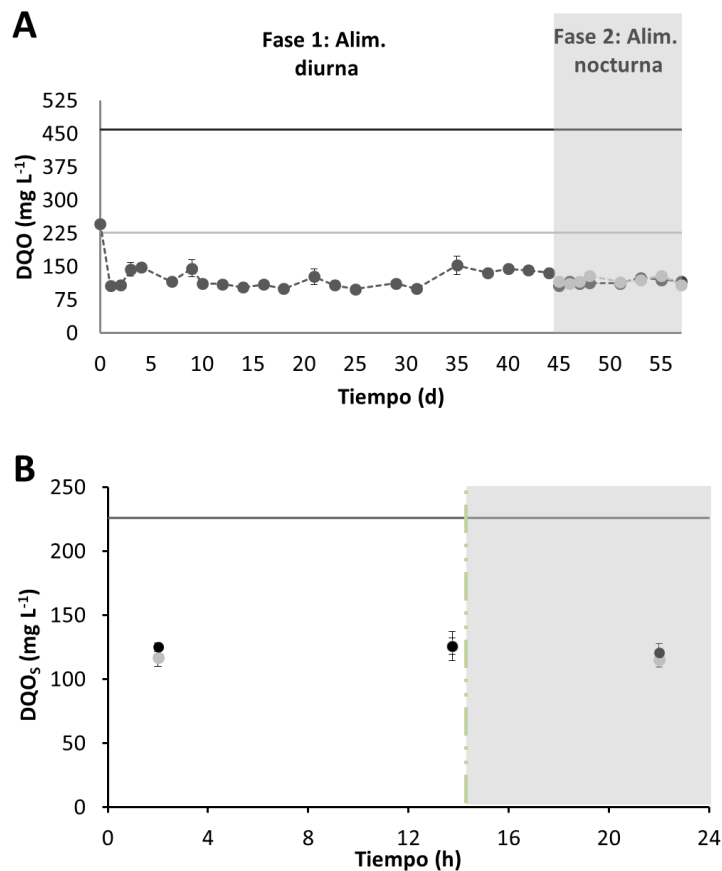


Figura 4.36. Evolución de la eliminación de DQO durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1 (●) y Fase 2 (FBR A, Cerrado (●) y FBR B, Abierto (●)). A) Las líneas continuas representan la concentración de DQO en el influente: DQO_T (—) y DQO_S (—). La línea discontinua (— —) representa la concentración de DQO_S del efluente. B) Evolución de la DQO_S en las tres horas de muestreo durante la Fase 2. El período de iluminación se representa con fondo blanco □ y el período de oscuridad con fondo gris ■. La adición de influente se refleja con la línea discontinua vertical verde (—).

Eliminación de N-NH₄⁺

Durante la operación de los FBRs en la Fase 2 se observaron mejoras en la eliminación de N. Cabe destacar que, en ninguna de las condiciones ensayadas, se encontró presencia de nitritos ni nitratos, probablemente debido a la escasez o inactividad de bacterias nitrificantes en los consorcios. En el FBR A se encontró una tendencia similar a la registrada durante la Fase 1, es decir, una concentración media en los efluentes de $30,8 \pm 1,4$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ y porcentajes de eliminación del $37,3 \pm 2,6\%$ (Figura 4.37.A). Estos valores coinciden con los obtenidos por Godos *et al.* (37%) [218]. En términos másicos representa una eliminación de $6,0 \pm 0,5$ mg N-

$\text{NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, estando en el rango encontrado en otros estudios a escala de laboratorio (6,6-7,1 $\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ [220, 225]). A pesar de esto, la eliminación de NT en el FBR A fue parcial, permaneciendo en el efluente la mayor parte del nitrógeno del influente (62,7%).

En el FBR B sí se registró una notable mejora en la eliminación del N-NH_4^+ durante la Fase 2. Durante la operación en el FBR B se encontraron eliminaciones del $95,9 \pm 2,6\%$ (Figura 4.37.A, Tabla 4.11), con concentraciones en el efluente de $2,0 \pm 2,8 \text{ mg L}^{-1}$. En términos de masa representó una eliminación de $15,6 \pm 1,9 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Esta notable mejora en la eliminación del NT se debió a que la operación abierta, facilitó la volatilización del N-NH_3 , forma en la que se encuentra mayoritariamente el N-NH_4^+ a los pH registrados durante la operación (57,6-94,5%). Los resultados en el FBR B están muy por debajo de los límites legales de descarga, cumpliendo con la normativa vigente más restrictiva.

La Figura 4.38 muestra el porcentaje de nitrógeno eliminado mediante los principales mecanismos en el FBR A (cerrado) y en el FBR B (abierto) durante la Fase 2. El nitrógeno eliminado en forma de biomasa en el FBR A, registró una disminución de 9,19 puntos porcentuales con respecto a la Fase 1 debido a la menor concentración de biomasa observada durante esta fase (Figura 4.38.A).

En el FBR B, las pérdidas por volatilización fueron las más elevadas, suponiendo una eliminación del $62,5 \pm 5,1\%$ del nitrógeno total presente en los influentes (Figura 4.38.B). Esta eliminación se debió al modo de operación del FBR B, ya que al estar abierto se favorece la volatilización del nitrógeno en forma de NH_3 . El nitrógeno eliminado en forma de biomasa representó el $34,8 \pm 6,2\%$ del total. Este valor fue similar a los registrados durante la Fase 1 ($29,8 \pm 2,9\%$).

A la vista de los resultados obtenidos puede concluirse que, este sistema de operación de los FBRs en abierto permite: I) eliminar la mayor parte del nitrógeno por volatilización y II) mantener los niveles de asimilación de nitrógeno en biomasa similares a los sistemas cerrados.

Tabla 4.11. Comparativa entre las concentraciones de N-NH_4^+ en los influentes, efluentes y los porcentajes de eliminación de los FBRs operados con TRH de 6 y 3 d y durante la Fase 1 y la Fase 2 (FBR B).

Eliminación de nitrógeno	TRH 6 d	TRH 3 d	TRH 3 d (Fase 1)	FBR B (Fase 2)
Concentración influente (mg $\text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	$62,3 \pm 2,3$	$36,2 \pm 18,2$	$49,2 \pm 3,6$	$49,2 \pm 3,6$
Concentración efluente (mg $\text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	$34,0 \pm 7,8$	$10,0 \pm 7,7$	$31,8 \pm 1,5$	$1,3 \pm 1,3$
Porcentaje en biomasa	$45,7 \pm 6,5$	$54,5 \pm 21,2$	$29,8 \pm 2,9$	$34,8 \pm 6,2$
Porcentaje en pérdidas (volatilización)	$11,2 \pm 9,7$	$16,9 \pm 12,1$	$5,7 \pm 3,9$	$62,5 \pm 5,1$
Porcentaje de eliminación	$56,9 \pm 10,1$	$71,4 \pm 20,3$	$35,4 \pm 3,1$	$97,3 \pm 2,7$

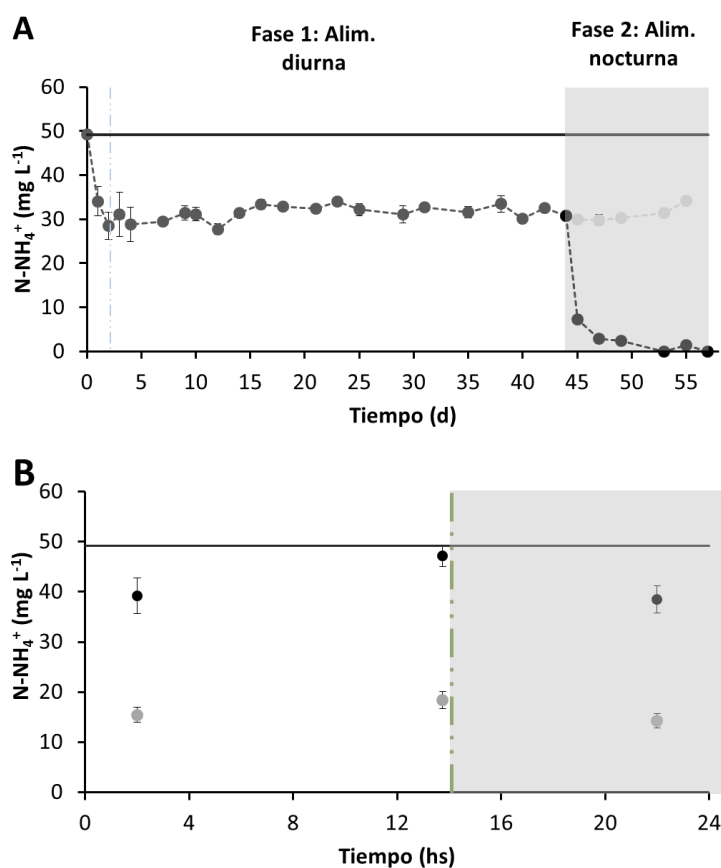


Figura 4.37. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1 (●) y Fase 2 (FBR A, Cerrado (●) y FBR B, Abierto (●)). A) La línea continua gris (—) representa la concentración en el influente. La línea discontinua (— —) representa la concentración en el efluente. B) Evolución del N-NH_4^+ en las tres horas de muestreo durante la Fase 2. El período de Iluminación se representa con fondo blanco □ y el período de oscuridad con fondo gris ■. La adición de influente se reflejan con la línea discontinua vertical verde (—).

El análisis de la evolución del N-NH_4^+ en el reactor cerrado durante los ciclos diarios, reveló concentraciones muy similares en las muestras analizadas a distintas horas (29-37%). Estos valores estaban en el rango de los obtenidos en la Fase 1 (Figura 4.37.B). En cambio, en el FBR B (abierto), a las 8 h del comienzo del período de oscuridad, la eliminación fue del 74,5%. 4 horas más tarde (dos horas de iluminación) aumentó ligeramente hasta el 79,6%. Tras 14 horas de iluminación, en la descarga, se alcanzó un porcentaje del 95,9% de eliminación. Debido a que la volatilización del NH_3 es un fenómeno abiótico y ocurre a favor de gradiente químico con la atmósfera, puede concluirse que se alcanzaron mayores velocidades de eliminación en el periodo después de la alimentación.

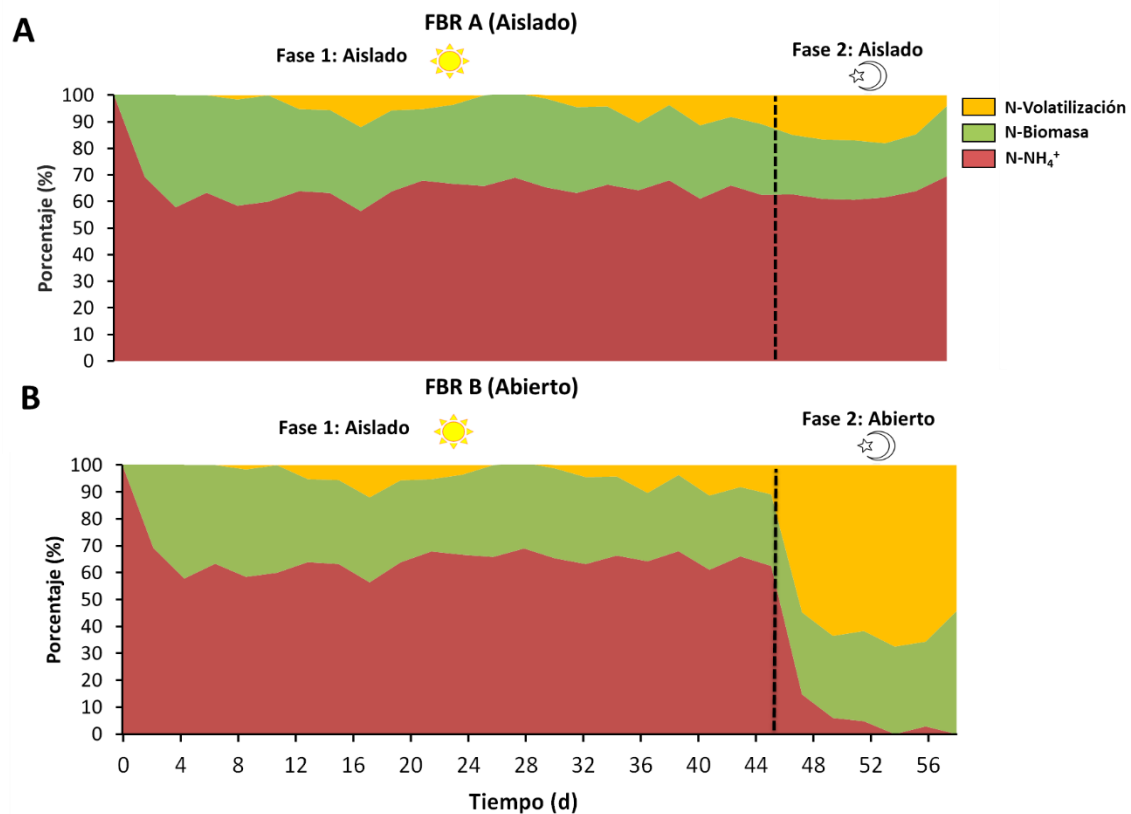


Figura 4.38. Evolución de los distintos mecanismos de eliminación de nitrógeno (%) durante la operación en semi-continuo con TRH de 3 d durante la Fase 1 y la Fase 2. A) Evolución de la eliminación de nitrógeno en el FBR A (cerrado). B) Evolución de la eliminación de nitrógeno en el FBR B (abierto).

Evolución sólidos suspendidos volátiles, SSV

Los resultados obtenidos con ambos FBRs durante la Fase 2 son semejantes a los valores publicados por otros autores (0,150 y 0,450 g L⁻¹ [58, 218, 228, 231]) y con resultados del ensayo previo de TRH de 3 días (0,29 ± 0,05 g SSV L⁻¹, Pág. 109) a pesar de las diferencias en el diseño experimental entre ambos experimentos que dificultan una comparación estricta.

Al analizar los resultados del FBR B (abierto) se aprecia un aumento de los SSV de 54,5 puntos porcentuales al compararlos con el FBR A (Figura 4.39.A). El método de operación abierto (FBR B) permite un mayor intercambio de gases con la atmósfera, concretamente de CO₂, contribuyendo a atenuar el efecto de la baja relación C/N, característico de las aguas residuales urbanas [47]. El aumento del rendimiento en la producción de biomasa como consecuencia de la operación en abierto se aprecia con mayor claridad al analizar las muestras recogidas en diferentes momentos del ciclo diario (Figura 4.39.B). Cabe destacar que un aumento de biomasa supone una mayor asimilación de nutrientes de los influentes.

Al comparar los resultados de la muestra correspondiente a las 14 h del ciclo diario en los FBRs A y B, se aprecia que los valores medios son un 50,9 puntos porcentuales superiores en el FBR B abierto. Además, la operación en régimen abierto permite reducir el exceso de oxígeno en el medio de cultivo, contribuyendo a minimizar el proceso de fotorrespiración descrito en el Apartado 2.3.4 (Pág. 48).

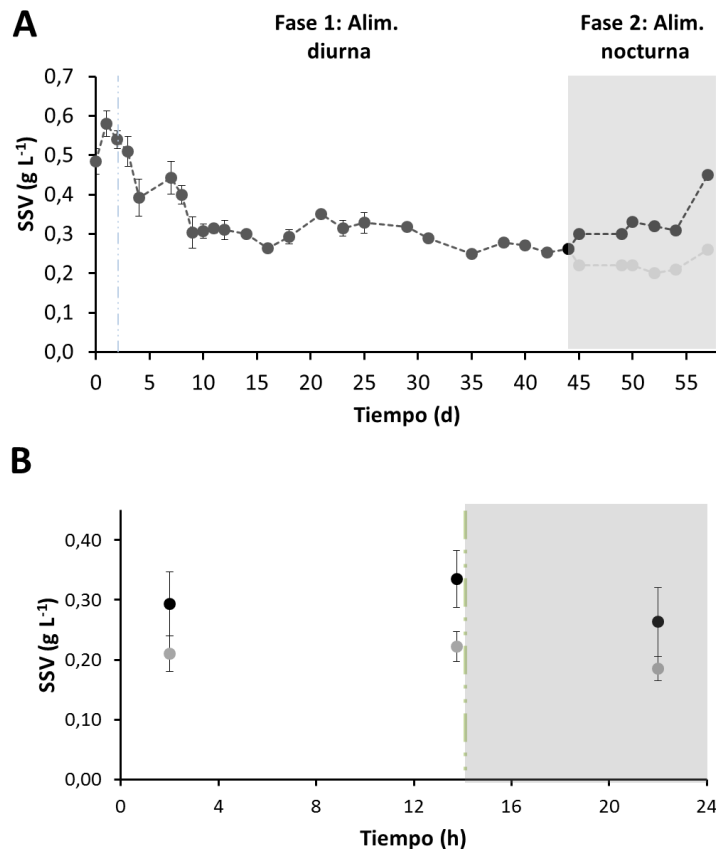


Figura 4.39. Evolución de la concentración de biomasa (SSV) durante la operación con TRH de 3 d-Fase 1 (●) y Fase 2 (FBR A, Cerrado (●) y FBR B, Abierto (●)). A) La línea discontinua (---) representa la concentración en el efluente. B) Evolución de los SSV en las tres horas de muestreo durante la Fase 2. El período de Iluminación se representa con el fondo blanco y el período de oscuridad con fondo gris. La adición de influente se reflejan con la línea discontinua vertical verde (---).

4.5.2. Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en la Fase 1 y 2: secuenciación masiva de ADN

Como ya se ha comentado, la eliminación de la fracción biodegradable de la materia orgánica fue muy efectiva (86-88%) en los FBR operados según las condiciones descritas en el Apartado 4.5.1. (Tabla 4.10, Pág. 148). Por ello, se puede determinar que el método de operación, cerrado o abierto, no tuvo un efecto determinante en la eliminación de DQO. Este hecho sugiere que las poblaciones desarrolladas en este ensayo pueden ser más adecuadas para el proceso de depuración que las desarrolladas en los anteriores fotobiorreactores.

El conocimiento de la diversidad y abundancia de las distintas especies que integran el consorcio es de gran importancia para entender los procesos metabólicos que ocurren durante

el proceso de depuración en los FBRs. Por lo tanto, se decidió realizar un análisis de la composición de la diversidad microbiana de las poblaciones establecidas en los cultivos. Para ello se empleó la secuenciación masiva de ADN MiSeq de Illumina.

Las muestras analizadas procedieron del inicio del cultivo y de los días 41 y 57 de operación (t0, t41 y t57). La muestra procedente del día 41 corresponde al período de operación en cerrado y alimentado durante la fase lumínica. Las muestras t57 *a* y t57 *b*, procedentes del FBR A y B respectivamente, se tomaron de los reactores alimentados en la fase de oscuridad. Con el análisis por secuenciación masiva de ADN de las muestras 57 *a* y *b* se persiguió detectar las posibles diferencias en las poblaciones bacterianas como consecuencia de la operación del reactor en cerrado o abierto.

Evolución de las poblaciones de microalgas

En todas las muestras analizadas fue posible identificar las especies presentes puesto que las curvas de rarefacción de los ensayos de los análisis de ADN masivo fueron bastante estables, alcanzándose en todas ellas el estado estacionario (Figura 4.40). Prácticamente al 100% de las secuencias de las muestras analizadas fue posible asignarles un grupo taxonómico. El número de secuencias obtenidas para las secuencias amplificadas del gen de la RuBisCO (*rbcl*) fue de entre 26.535-28.180, con una longitud de dichas secuencias de entre 499-511 pb y una calidad medida (Q) superior a 36, determinando una precisión de la secuenciación superior al 99,9% (Tabla 4.12). Los resultados muestran que las poblaciones de microalgas de la muestra inicial y las 41 y 57 *a* y *b* son sensiblemente distintas.

La disminución del índice de biodiversidad durante la operación de los FBRs se explica por la dominancia de una única especie de microalga. A nivel de especie, la muestra inicial mostró el mayor índice Shannon-Wiener (H') de diversidad (0,485), seguido de la muestra 57 *b* con un valor de 0,293 (Figura 4.41). Las muestras 41 y 57 *a* mostraron menores índices Shannon-Wiener: 0,124 y 0,180 respectivamente. Estos resultados señalan que el método de operación cerrado promueve la reducción de la biodiversidad de microalgas.

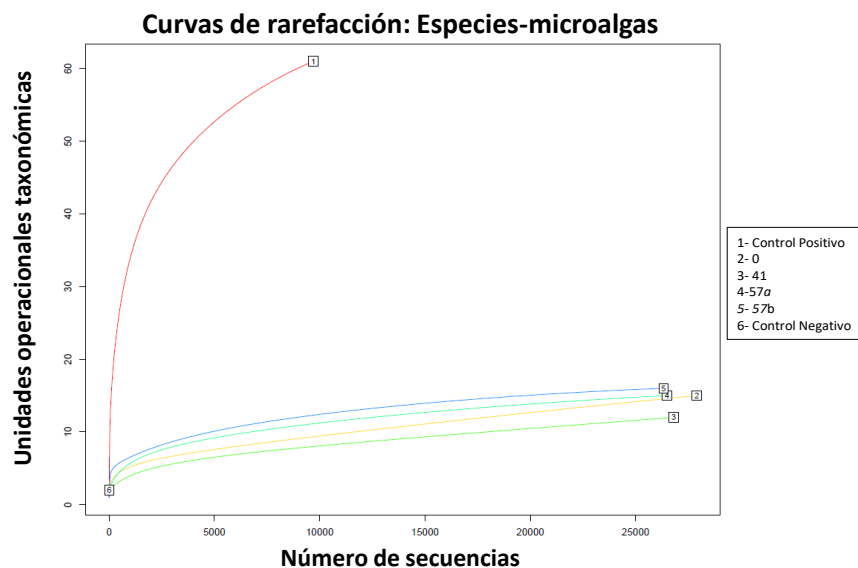


Figura 4.40. Curvas de rarefacción obtenidas del análisis de las especies de microalgas de las muestras: t0, t41, t57 *a* y *b*.

Tabla 4.12. Columnas de izquierda a derecha: Muestra, gen amplificado, número total de secuencias, longitud media, número total de bases secuenciadas y calidad media (Q).

Muestra	Gen	Número de secuencias	Total Mb	Long. Media (pb)	Phred quality scoring (Q)
0	rbcl	28.180	8,6	511	36,8
41	rbcl	26.859	8,2	506	36,7
57a	rbcl	26.535	8,1	499	36,7
57b	rbcl	26.880	8,1	510	36,8
0	16S	65.282	21,5	413	37,1
41	16S	54.136	18,2	413	37,1
57a	16S	50.536	16,8	415	37,1
57b	16S	35.924	12,2	409	37,1

El hecho de que el valor del índice de la muestra t57 *b* (procedente del FBR B abierto a la atmósfera), sea superior al de las muestras t41 y t57 *a* puede explicarse por la posible incorporación al fotobiorreactor abierto de microalgas presentes en el ambiente.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de otros autores como Posadas *et al.* (H' de 2,8-3,3), se puede constatar la baja biodiversidad de las poblaciones de microalgas en los presentes FBRs [269]. Esto se pudo deber a que Posadas *et al.* emplearon sistemas abiertos tipo *raceway* para sus ensayos, más susceptibles de intercambios con el medioambiente que los FBRs de 1L empleados en este trabajo. Debe resaltarse que la

dominancia de una única especie también se ha documentado en los sistemas abiertos [158, 216, 239-241].

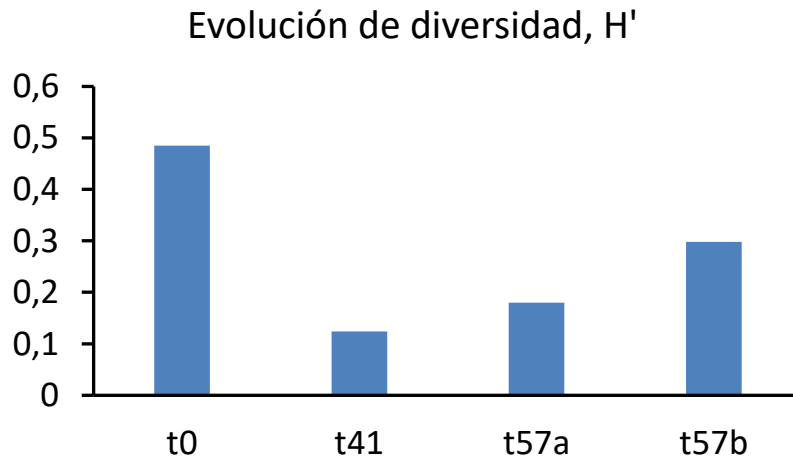


Figura 4.41. Evolución del índice Shannon-Wiener para las poblaciones de microalgas en las muestras: t0, t41, t57 a y b.

En la muestra inicial del cultivo, la especie predominante de microalgas fue *Chlorella sorokiniana*, representando un 80% del total de la población (Figura 4.42). En este análisis también se detectó la presencia de un grupo de microalgas perteneciente a la clase *Trebouxiophyceae* (carente de identificación a nivel de especie) con una abundancia del 17%. Tanto en el presente ensayo como en el previo, a pesar de las diferentes técnicas empleadas para la identificación (Illumina vs. DGGE) que imposibilitan una comparación estricta, se encontró la presencia mayoritaria del género *Chlorella* probablemente debido a que el inóculo fue el mismo en ambos casos.

El análisis de las muestras t41 y t57 a y b muestra cambios significativos en la composición de las comunidades de microalgas que no se observó en la muestra del inóculo. En estas muestras la especie dominante fue *Desmodesmus multivariabilis* (88-97%) de la familia *Scenedesmaceae*, disminuyendo hasta el 3-4% la abundancia relativa de *C. sorokiniana*.

Tampoco se observaron diferencias en la operación de los FBRs operados en abierto o cerrado, siendo la especie dominante *D. multivariabilis* (95% vs. 88%), por lo que puede concluirse que el sistema de operación no influyó en la composición de las comunidades de microalgas.

El cambio notable que se produce entre las especies mayoritarias y minoritarias durante la operación de los FBRs puede explicarse por la mayor tasa de crecimiento, y por lo tanto mayor capacidad de asimilación de nutrientes, de *D. multivariabilis* frente a *C. sorokiniana* y su mejor adaptación al régimen hidráulico impuesto. Massimi y Kirkwood aislaron diferentes cepas de microalgas de ambientes acuáticos y compararon sus velocidades de crecimiento [109]. Estos autores encontraron que determinadas cepas de *Desmodesmus* pueden presentar velocidades de crecimiento de 1,07-1,22 d⁻¹ superiores a las de algunas cepas del género *Chlorella* (0,42-0,75 d⁻¹).

Esta velocidad de crecimiento mucho mayor de *Desmodesmus* podría explicar la mayor eficiencia del proceso de depuración con respecto al ensayo previo con TRH de 3 días (Tabla 4.7 Tabla 4.8, Págs. 138 y 140, respectivamente). En el ensayo analizado por DGGE en el que se encontró una clara dominancia de *C. sorokiniana*, la eliminación de la fracción biodegradable de la DQO_s fue escasa (64,2 ± 4,8%) debido a las posibles secreciones de SPE de la biomasa microalgal. Existen referencias en la literatura de liberación de SPE en cepas del género *Chlorella* [208, 209]. En cambio en los ensayos con FBRs cerrados y abiertos (Apartado 4.5.1, Pág. 136), en los que *D. multivariabilis* fue la especie dominante, los porcentajes de eliminación de materia orgánica aumentaron hasta superar el 85% del contenido biodegradable del influente. No existen evidencias en la literatura sobre producción de SPE por parte de microalgas del género *Desmodesmus*.

La familia *Scenedesmaceae* y el género *Desmodesmus*, a la que pertenece *D. multivariabilis*, ha sido aislada en múltiples ocasiones de ambientes acuáticos como lagos y lagunas [270, 271] y empleada en el tratamiento de aguas residuales [77, 271, 272]. Sin embargo, a pesar de ser género habitual en estos ecosistemas, la especie *D. multivariabilis* ha sido escasamente empleada en la depuración de aguas residuales, aunque existen estudios recientes en los que se ha empleado para la eliminación de metales pesados y tierras raras [273, 274].

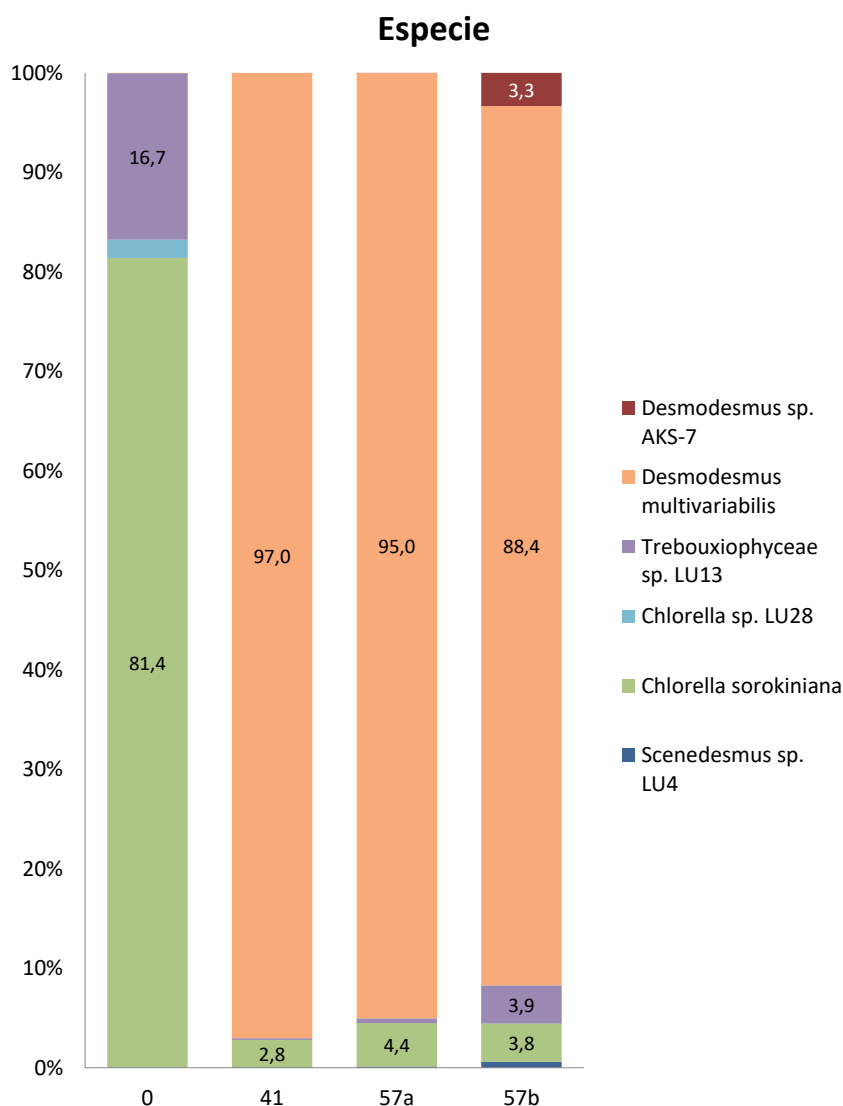


Figura 4.42. Abundancia de las distintas especies de microalgas presentes en las muestras correspondientes a los días 0, 41 y 57.

Caracterización de las poblaciones procariotas

La composición de las poblaciones bacterianas varió significativamente durante el tratamiento con la operación en semi-continuo. Los cambios poblacionales se vieron reflejados en los resultados de la secuenciación de ADN masiva de las muestras 0, 41 y 57a y b. Las curvas de rarefacción permitieron determinar el grado de identificación hasta género (Figura 4.43). Al igual que ocurría en el análisis de las poblaciones de microalgas, las curvas de rarefacción alcanzaron un estado de saturación, por lo que se puede identificar la práctica totalidad de los géneros presentes en las muestras. El número de secuencias obtenidas para las secuencias amplificadas del gen ribosomal 16S fue de entre 35.924-65.282, con una longitud de entre 409-

413 pb y una calidad medida (Q) superior a 37, resultando en una precisión de la secuenciación superior al 99,9% (Tabla 4.12, Pág. 156).

Para realizar el análisis de los resultados se normalizaron las secuencias obtenidas, restringiendo las secuencias no asociadas a ningún grupo taxonómico. En los casos en los que fue posible, las secuencias se reasignaron a grupos que, durante el análisis primario, no pudieron asociarse a ningún grupo.

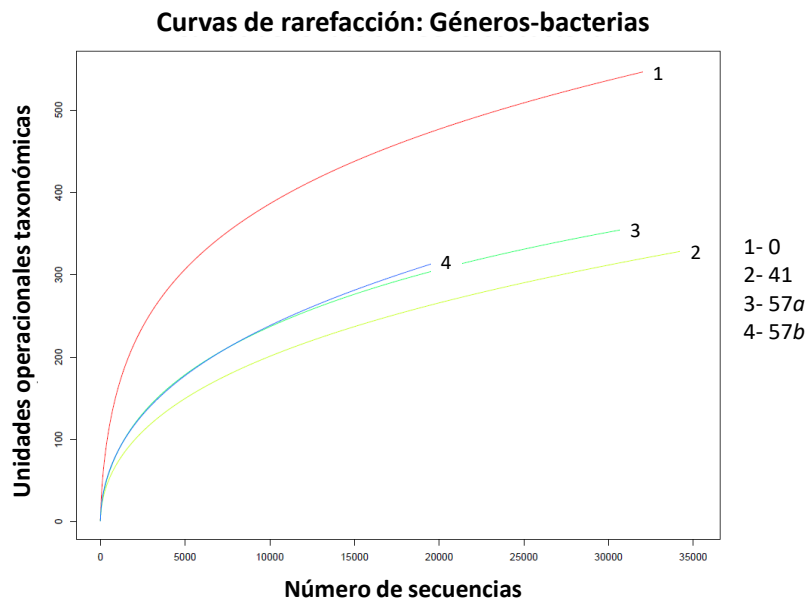


Figura 4.43. Curvas de rarefacción obtenidas del análisis de géneros procariotas de las muestras: 0, 41, 57 *a* y *b*.

A pesar de la valiosa información que aportan las técnicas basadas en el análisis masivo de ADN, como es el caso de la plataforma Illumina MiSeq, debe tenerse en cuenta las características genéticas en las que se fundamenta. Esta técnica se basa en la cuantificación de las secuencias del fragmento del gen ribosomal 16S de cada uno de los grupos taxonómicos (*OTUs*, unidades taxonómicas operacionales) para determinar la abundancia relativa de cada grupo. Hay especies que en su genoma pueden tener múltiples copias del gen 16S desde una hasta 15, hecho que puede inducir a error en el análisis de las abundancias relativas [275, 276]. Esto supone una dificultad añadida a la hora de realizar los análisis de las abundancias relativas de cada *OTU*. Para resolver este problema se han desarrollado métodos filogenéticos basados en la comparación de los resultados con las bases de datos genéticas para determinar que *OTUs*

presentan más de una copia del gen 16S [276, 277]. Cabe destacar que este tipo de métodos requieren acudir a fuentes genómicas fiables y esto no siempre es posible para todas las *OTUs* presentes en las muestras. La mayor parte de las especies no cuentan con una secuenciación completa de su genoma, lo que imposibilita conocer el número de copias exactas del gen 16S que presentan [276, 277]. Este hecho puede generar una sobrerrepresentación de los grupos en los que su genoma no está completamente secuenciado en perjuicio de las especies que se conoce el número exacto de copias del gen. En consecuencia, algunos autores han desarrollado métodos estimativos de biología comparada para intentar resolver el problema [275-277]. A pesar de los esfuerzos invertidos para esta labor, aún presentan grandes sesgos que no permiten resolver el problema [275].

Análisis de la diversidad: Índice Shannon-Wiener

La muestra que mostró un mayor índice Shannon-Wiener (H') de géneros bacterianos fue la t0 correspondiente al inóculo con un valor de 2,30 (Figura 4.44). La muestra correspondiente al final de la Fase 1 de operación (t41) obtuvo un valor de 0,95, seguida por la muestra t57 *a*, correspondiente al final de la fase 2 del FBR A operado en condiciones cerradas, con un valor de 1,00. La muestra t57 *b*, también del final de la Fase 2 del FBR B (abierto), mostró un valor de 1,23. Los resultados del índice de biodiversidad procariota siguieron la misma tendencia que los encontrados en el análisis de microalgas. La operación en cerrado promueve la disminución de la biodiversidad de los consorcios.

La disminución del valor de H' entre la muestra t0 y las correspondientes al final del ensayo pudo deberse al efecto selectivo de las condiciones que se generan como consecuencia de la operación del biorreactor (concentración de OD, pH, iluminación e interacciones ecológicas microalgas-bacterias). Bajo estas condiciones se seleccionan grupos bacterianos específicos y desaparecen otros que estaban presentes en el inóculo. En las muestras t41 y t57 *a* se obtuvieron valores de H' muy similares (0,951 y 0,967, respectivamente). En cambio, en la muestra t57 *b* (reactor abierto), el valor de H' fue ligeramente superior (1,23) debido probablemente a la presencia de microorganismos del ambiente que contribuyeron a aumentar la biodiversidad.

La técnica de secuenciación masiva con la plataforma MiSeq de Illumina basada en terminadores reversibles, es una técnica novedosa y, en la actualidad, no existen muchos trabajos publicados en los que se haya empleado esta técnica para estudiar la biodiversidad de

consorcios mixtos para el tratamiento de aguas. Aunque los índices de biodiversidad bacteriana de las muestras t41 y t57 (0,95-1,23) son ligeramente inferiores a las encontradas en estudios sobre tratamiento de aguas residuales con microalgas-bacterias (1,77-4,43), la tendencia a una reducción de la diversidad a lo largo del proceso de depuración es similar a los resultados encontrados por otros autores [278, 279]. En el estudio realizado por Carney *et al.* la reducción en la diversidad de microorganismos procariotas, se vinculó a la dominancia de bacterias asociadas al crecimiento de las microalgas [280].

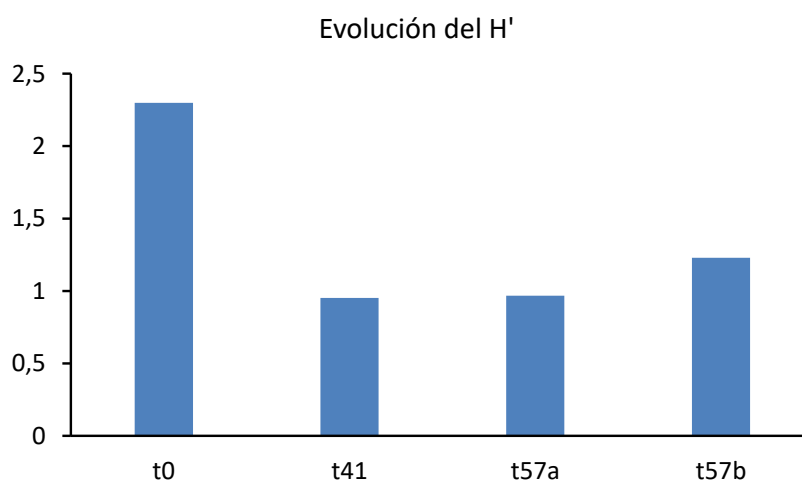


Figura 4.44. Evolución del índice Shannon-Wiener para las poblaciones de bacterias en las muestras t0, t41 y t57 *a* y *b*.

Filos-clases

En la muestra inicial del cultivo (t0), los filos bacterianos con mayor representación fueron *Proteobacteria* (76,6%), seguido por *Bacteroidetes* (10,3%), *Firmicutes* (8,0%) y *Actinobacteria* (4,5%). En las muestras correspondientes a los días 41 y 57 de tratamiento, la composición microbiana fue relativamente similar (Figura 4.45); *Proteobacteria* (81-90%), *Bacteroidetes* (4,3-13,5%), *Firmicutes* (2,16-4,6%) y *Verrucomicrobia* (1,0-2,5%). Al igual que en el análisis de la DGGE, a pesar de las grandes diferencias entre las técnicas empleadas, no se encontraron miembros pertenecientes al filo *Cyanobacteria*.

Debido a las escasas referencias en la bibliografía sobre estudios similares, la comparación con otros trabajos solo es posible realizarla, en la mayoría de los casos, en términos de ausencia o presencia de los microorganismos. Los estudios centrados en la caracterización y

cuantificación de las poblaciones bacterianas asociadas a bacterias también son escasos y, en muchas ocasiones, se han realizado en temáticas de producción de biomasa algal fuera del ámbito de la depuración [166, 281].

La abundante presencia de *Proteobacteria* en la muestra inicial se corresponde a lo habitual en los fangos activos y las aguas residuales urbanas en las que este filo bacteriano es el dominante. En el estudio realizado por Ye y Tong, *Proteobacteria* fue el grupo más numeroso, tanto en el fango activo como en las aguas residuales, con una frecuencia del 36-60%, respectivamente [256]. Wang *et al.* encontraron que, en 14 muestras de fango activo de diferentes EDAR, *Proteobacteria* fue el filo más numeroso con frecuencias comprendidas entre el 21-51% [168]. El segundo filo mayoritario fue *Firmicutes* (20,2%) [251]. Los siguientes filos más abundantes en las muestras analizadas por Wang *et al.* corresponden a *Bacteroidetes* (11-64%) y con *Actinobacteria* (1-27%).

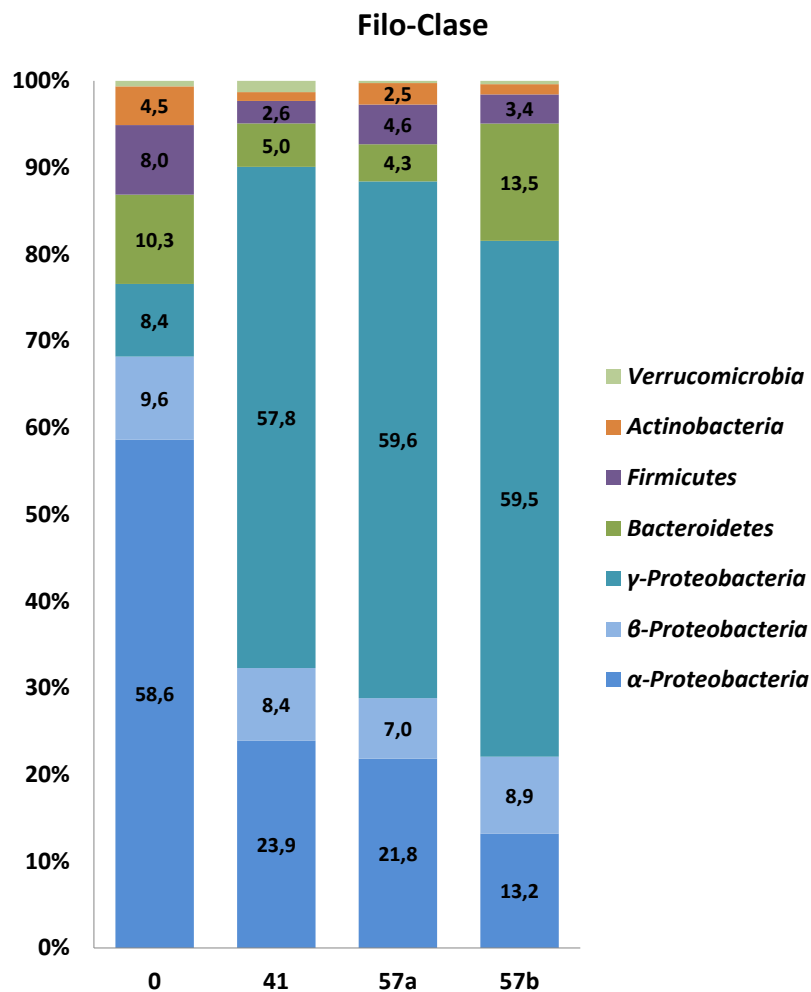


Figura 4.45. Evolución de los filos-clases de bacterias en las muestras: t0, t41, t57 a y b.

Filo *Proteobacteria*

El filo *Proteobacteria* fue el filo más abundante durante toda la operación. Dentro de éste, se detectó una variación en la composición de géneros entre la muestra inicial y las correspondientes a los días 41 y 57 de cultivo.

Como se mencionó previamente, *Proteobacteria* fue el filo bacteriano más numeroso en todas las muestras. Su abundante presencia se debe a que *Proteobacteria* se caracteriza por ser un grupo microbiano muy diverso que engloba bacterias con metabolismos fotótrofos (anoxigénicos) y quimioorganotrofos, por lo que las condiciones de los fotobiorreactores alimentados con aguas residuales, abundantes en nutrientes, puede favorecer su desarrollo [20].

En la muestra inicial, las clases con mayor abundancia fueron α -*Proteobacteria* (58,6%), seguidas por β -*Proteobacteria* (9,6%), y γ -*Proteobacteria* (8,4%) (Figura 4.45). Después de 41 y 57 días de operación, las clases dominantes sufrieron cambios sustanciales con respecto a la muestra inicial. Las más abundantes pasaron a ser γ -*Proteobacteria* (57,8-59,5%), seguidas por α -*Proteobacteria* (13,2-23,9%) y β -*Proteobacteria* (7,0-8,9%). Las γ -*Proteobacteria* se caracterizan por desarrollarse en coexistencia con las microalgas y por ello se favorece su desarrollo durante el proceso de depuración. Este desarrollo ya ha sido observado por otros autores aunque las abundancias difieren con las encontradas en el presente trabajo [120, 159, 165, 282]. Estas diferencias pueden deberse a las distintas condiciones empleadas en los diferentes estudios: I) diferencias basadas en los sistemas de cultivo en *batch* o en dispositivos tipo *raceway* alimentados con distintos influentes [159, 165, 282], II) diseño experimental basado en la alternación de fases aerobias y anóxicas [120] y/o III) uso de una técnica de detección no cuantitativa como es la DGGE [120, 159, 165, 282]. En los resultados obtenidos en los ensayos previamente descritos usando la técnica DGGE (Apartado 4.3.1, Pág. 116), la dominancia de γ -*Proteobacteria* tampoco se vio reflejada, aunque nuevamente, resulta difícil una comparación rigurosa entre técnicas tan diversas.

Fulbright *et al.* [166], en su estudio de producción de la microalga marina *Nannochloropsis salina*, observaron predominio de γ -*Proteobacteria*. También Carney *et al.* encontraron una clara dominancia de esta clase con porcentajes próximos al 75% de las secuencias totales en su estudio de depuración de aguas residuales [280].

Clase α -Proteobacteria

En la muestra t0, del grupo de las α -Proteobacteria (58,6%), el género más abundante fue *Shinella* fue (59,5%). Con mucha menor abundancia, también se identificaron géneros como *Mesorhizobium* (1,6%) y *Roseomonas* (0,9%) (Figura 4.46).

La presencia *Shinella* en la muestra del cultivo inicial es coincidente con los resultados de la técnica DGGE. Aunque los inóculos del fango activo procedieron de lotes distintos ambos fueron obtenidos de la EDAR de Castellón de La Plana lo que podría explicar esta coincidencia.

En las muestras correspondientes a los días de muestreo 41 y 57 (*a* y *b*), las α -Proteobacteria fueron la segunda clase más abundante (13,2-23,9%) (Figura 4.45), en proporción significativamente menor que la de la muestra inicial. La composición de géneros fue muy diferente en estas muestras en comparación con la inicial. *Shinella* prácticamente desapareció y disminuyó su porcentaje del 59,5 al 0,1-0,2%. Una vez más, este cambio poblacional se atribuyó a las elevadas presiones parciales de oxígeno registradas en los FBRs.

Shinella, el género bacteriano de mayor dominancia en la muestra inicial, es un género que suele habitar ambientes anaerobios como reactores de digestión anaerobia [283] o micro-aerobios como son los tanques de tratamiento secundario (fangos activos). Este hecho conlleva que su propagación sea difícil en FBRs [284].

Por otro lado, el grupo de las bacterias púrpuras fotótrofas aumentó su presencia en los reactores pasando de un 0,1% en la muestra inicial a 2,2-3,4% en las muestras t41, t57 *a* y *b* con *Rhodobacter* como género más abundante (Figura 4.46). El aumento de la presencia de este género durante el tratamiento también se observó cuando se usó la DGGE como método de identificación (Apartado 4.3.1, Pág. 116). A pesar de que las técnicas de identificación fueron distintas, hecho que imposibilita una comparación estricta, el aumento de la familia *Rhodobacteraceae* en ambos experimentos podría deberse a las condiciones de cultivo en los FBRs. Como fue mencionado previamente, esta familia pertenece al grupo de las bacterias púrpuras fotótrofas capaces de realizar la fotosíntesis anoxigénica, por lo que las condiciones de cultivo fotótrofo pueden favorecer su desarrollo [83, 84].

En la muestra inicial, el género *Sphingomonas* apenas representó el 0,2% de la población bacteriana total, mientras que su relevancia aumentó hasta el 13,0% el día 41 y en el día 57 en el reactor cerrado (*a*) 11,4% y en el abierto (*b*) 3,3%. Este aumento se debió a que la familia *Sphingomonadaceae*, a la que pertenece este género, es un linaje bacteriano formado por un versátil grupo de bacterias aerobias, quimioorganotrofas y, algunos géneros sintetizan

bacterioclorofila a, por lo que pueden realizar la fotosíntesis [285]. Esta variedad de metabolismos explica el hecho de que *Sphingomonas*, se encuentre de manera frecuente en cultivos fotosintéticos y en sistemas de tratamiento de aguas [164, 207, 281, 285, 286]. Estas características son favorables para el tratamiento de agua residual urbana. Por lo tanto, su presencia en los FBRs es un indicador de que la eliminación de materia orgánica se realizará de manera eficiente, tal y como se refleja en las elevadas tasas de eliminación de DQO (superiores al 85% de la fracción biodegradable de la DQO₅).

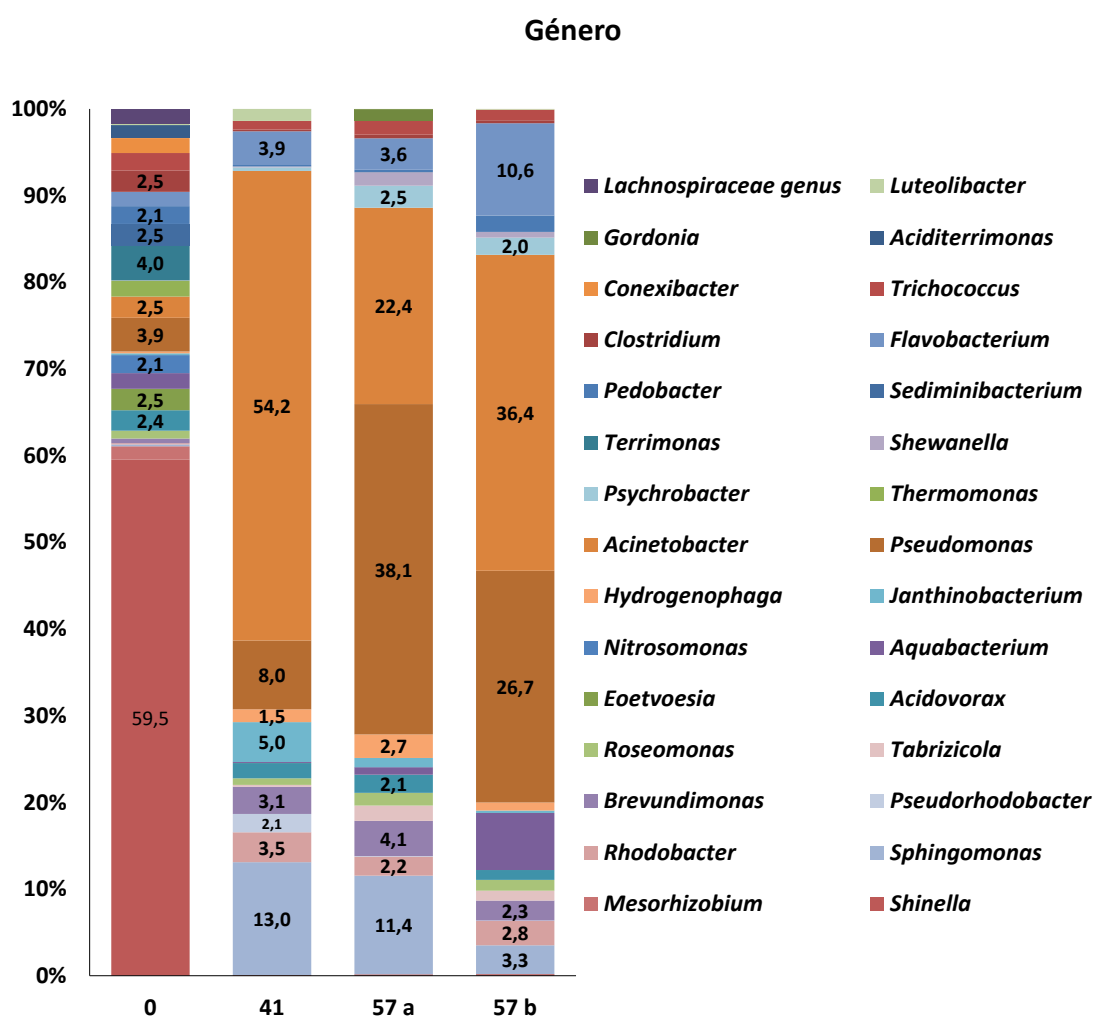


Figura 4.46. Evolución los géneros bacterianos en las muestras: t0, t41, t57 a y b.

Clase *β-Proteobacteria*

La clase *β-Proteobacteria* presentó porcentajes similares en todas las muestras (7,0-9,6%, Figura 4.45). Los miembros de la clase *β-Proteobacteria* han sido asociados como los principales

responsables de la eliminación de la materia orgánica de las aguas residuales, por lo que su presencia durante toda la operación en los FBRs puede ser un indicativo de un consorcio microalgas-bacterias adecuado [247].

Los géneros más representativos de esta clase fueron *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Janthinobacterium*, *Eoetvoesia*, *Aquabacterium* y *Nitrosomona* (Figura 4.46s, (Figura 4.46). Cabe mencionar que los géneros más representativos de esta clase fueron minoritarios y en ninguna de las muestras superaron una abundancia mayor al 6%.

Nitrosomonas, es uno de los géneros más importantes de este grupo en el tratamiento de aguas, puesto que tiene la capacidad de oxidar el NH_4^+ a NO_2^- , primera fase de la nitrificación necesaria para la eliminación del N de las aguas residuales [13, 20]. La escasa presencia de este género de bacterias (2,1%, Figura 4.46) en el inóculo bacteriano se pudo deber a que la planta de tratamiento de aguas de Castellón de la Plana carece de sistemas de eliminación de nitrógeno por nitrificación-desnitrificación.

Estos microorganismos desaparecieron totalmente en las muestras recogidas los días 41 y 57. Es sabido que la nitrificación y, *Nitrosomonas* en particular, se ven inhibidas a pH superiores a 9,6 [27, 223], valores próximos al pH registrado en este ensayo como se aprecia en la Figura 4.32 (Pág. 143). Además las bacterias nitrificantes y las microalgas compiten por los mismos sustratos (NH_4^+ y CO_2). De este modo, la actividad fotosintética de las microalgas pudo provocar condiciones limitantes para el crecimiento de las bacterias oxidadoras de NH_4^+ [163, 224]. Estos hechos explicarían la nula concentración de nitritos durante la operación (Figura 4.38, Pág. 152).

Clase γ -Proteobacteria

La tercera clase de *Proteobacteria* más abundante encontrada en la muestra inicial del cultivo fue γ -*Proteobacteria* (8,4%). En cambio, esta clase de bacterias fue la más abundante en términos totales (57-59%) en las muestras de los días 41 y 57 (Figura 4.45). Los integrantes de esta clase han sido descritos en estudios sobre la eliminación de nutrientes y tratamientos de aguas empleando consorcios de microalgas-bacterias [161, 280].

La considerable presencia de γ -*Proteobacteria* en estudios de tratamiento de aguas se debe a la versatilidad metabólica que presentan los géneros de este grupo. Como ejemplo, cabe destacar la capacidad de *Pseudomonas* para la eliminación de compuestos orgánicos [20, 157, 287]. Además, se ha detectado que los miembros de las γ -*Proteobacteria* tienen la capacidad de

sintetizar componentes promotores del crecimiento de las microalgas, hecho que estimula la simbiosis entre las bacterias y las microalgas [157, 288, 289]. Por tanto, la presencia de las *γ-Proteobacteria* en los cultivos pueda deberse tanto a los fangos activos como a los cultivos de microalgas usados como inóculos.

Como se aprecia en la Figura 4.46, el género *Pseudomonas* resultó ser uno de los más abundantes de los cultivos. En la muestra inicial su porcentaje apenas representó el 3,9%, incrementándose en la muestra t41 (7,9%) y aumentando considerablemente hasta el 38,1% en la t57 *a* y el 26,7% en la t57 *b*. Es preciso mencionar que las abundancias relativas del género *Pseudomonas* pueden ser inferiores debido a que sus miembros pueden presentar múltiples copias del gen 16S [290]. En este análisis, el rango de especie no fue alcanzado y, por lo tanto, no se puede determinar con exactitud las especies de *Pseudomonas* presentes en las muestras ni tampoco el número de copias del gen ribosomal 16S. El incremento de *Pseudomonas* también fue observado en los cultivos realizados en *batch* por Wang *et al.* [161] en los que detectaron que la presencia de este género aumentaba en los cultivos mixtos inoculados con fango activo y la microalga *C. sorokiniana*. Este aumento de *Pseudomonas* puede deberse a las características metabólicas y fisiológicas que presentan estas bacterias. La presencia del género *Pseudomonas* en sistemas de depuración biológica se debe a que tienen una gran plasticidad metabólica, pudiendo desarrollarse tanto bajo condiciones aerobias y anaerobias [291]. Además presentan la capacidad de crecer en ambientes micro-aerobios y emplear el nitrato y el oxígeno como aceptor de electrones, por lo que pueden participar tanto en la eliminación de materia orgánica como en el proceso de desnitrificación en el tratamiento de aguas [20, 292, 293].

La abundancia de *Acinetobacter* (22,6-54,2%) pudo deberse a que son aerobios estrictos y a la capacidad que presentan de metabolizar diferentes compuestos orgánicos [293]. Otra característica que les permite adaptarse a las condiciones de los cultivos fotosintéticos (radiación, OD y pH) es que posee catalasas [294]. Estas enzimas son necesarias para la eliminación de H₂O₂, especie química generada como respuesta a factores ambientales altamente oxidantes como es el medio acuático sobresaturado de oxígeno. *Acinetobacter* ha sido previamente descrita en estudios relacionados con el cultivo de microalgas y en el tratamiento fotosintético de aguas residuales [280, 295-298]. En el trabajo de Lu *et al.*, emplearon *Acinetobacter* para el estudio de la eliminación de nutrientes de aguas residuales en cultivos mixtos con microalgas. Estos autores mostraron que la eliminación de P en los cultivos mixtos aumentaba un 47,7% respecto a cultivos controles solo de microalgas y un 12,9% con los cultivos controles solo de *Acinetobacter* [298]. Al igual que en el caso de *Pseudomonas* es preciso mencionar que hay especies de *Acinetobacter* que pueden contener varias copias del gen 16S lo

que puede conllevar a una sobrerrepresentación de este género al realizar el análisis (cepas LR215977.1, CP015121.1 disponibles en NCBI [299]).

Acinetobacter se ha encontrado junto con *Pseudomonas*, en los sistemas de eliminación biológica de los tratamientos convencionales de aguas residuales [20, 168, 204, 207]. Carney *et al.* analizaron la abundancia (%) de los géneros bacterianos en un cultivo de algas en aguas residuales [280]. En los resultados encontrados por estos autores, a diferencia de los obtenidos en este trabajo, la frecuencia de este género nunca superó más del 10%, ni resultó ser el grupo bacteriano más abundante, probablemente debido al distinto diseño experimental. En su estudio Carney *et al.* usaron reactores tubulares dotados de sistemas de eliminación del exceso de oxígeno y sistemas de control del pH con inyección de CO₂, condicionando de esta manera el desarrollo del consorcio [280].

Pseudomonas y *Acinetobacter* debido a su presencia y relativa abundancia durante el tratamiento pudo ser el motivo del elevado porcentaje de eliminación de materia orgánica (DQO₅) total (46-48) y biodegradable (86-88%). No obstante, su abundancia en la muestra inicial fue muy minoritaria (*Pseudomonas* 3,4% y *Acinetobacter* 2,2%) y teniendo en cuenta la posibilidad de que estos géneros presenten varias copias del gen 16S su abundancia en la muestra inicial podría incluso ser inferior.

Filo *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*

Los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia* en la muestra inicial representaron el 23,4% de las secuencias totales identificadas, mientras que en las muestras 41 y 57 *a* disminuyeron hasta el 9,9 y 11,7%, respectivamente. En la muestra 57 *b* se observó un aumento de la población, alcanzando porcentajes del 18,5% (Figura 4.45).

En la muestra inicial *Bacteroidetes* supuso el 10,3%, seguido de *Firmicutes* (8,0%), *Actinobacteria* (4,5%) y *Verrucomicrobia* (0,6%). En las muestras correspondientes a los días de tratamiento 41 y 57 los filos *Firmicutes* (2,6-4,6%), *Actinobacteria* (1,0-2,5%) y *Verrucomicrobia* (0,3-1,3%), presentaron porcentajes similares.

El Filo *Bacteroidetes* representó el 5,0% a los 41 días de tratamiento y el 4,3% en la muestra 57 *a*. En el fotobiorreactor abierto, a los 57 días de proceso (muestra 57 *b*) el filo *Bacteroidetes* aumentó su presencia hasta valores similares a los de la muestra inicial (13,5%). Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la operación abierta (FBR B) favoreciese

el intercambio gaseoso (OD y NH_3), promoviendo el desarrollo este filo. *Bacterioidetes* posee miembros sensibles o poco tolerantes a los ambientes aerobios [280]. Este grupo de microorganismos se caracteriza por colonizar ambientes anaerobios aunque algunos miembros presentan aerotolerancia [280, 300]. Esta aerotolerancia explicaría la persistencia de este filo en las muestras t41 y t57a (FBRs cerrados) con menores eliminaciones del OD.

En la muestra inicial, los géneros encontrados han sido previamente identificados en los sistemas de tratamiento de agua residual; influente y fangos activos: *Terrimonas* [207], *Sediminibacterium* [301], *Pedobacter* [302], *Flavobacterium* [207], *Clostridium* [303], *Trichococcus* [207] y *Conexibacter* [304]. Estos géneros en las muestras procedentes de los días 41 y 57, desaparecieron o tuvieron una reducida presencia (Figura 4.46). Estos microorganismos son frecuentes en sistemas de tratamiento de aguas caracterizados por tener baja concentración de OD ($2\text{-}4\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$) y pH neutros (6-9) [13]. Dichos valores son inferiores a los encontrados a lo largo del tratamiento fotosintético llevado a cabo durante este desarrollo experimental (Figura 4.33, Pág. 144).

Los microorganismos identificados mediante el análisis masivo de ADN, como los miembros géneros *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* son frecuentes en los fangos activos de las EDAR empleados para la eliminación de materia orgánica. La co-dominancia de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* en los FBRs podría explicar la buena eliminación de la fracción biodegradable de la materia orgánica obtenida. Las concentraciones medias en los efluentes de los ensayos en los que estuvieron presentes estos microorganismos fueron de $117,8 \pm 7,9\text{ mg DQO L}^{-1}$.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

1. La utilización de inóculos mixtos microalgas/bacterias mejoró la eliminación de los contaminantes de las aguas residuales en cultivos en *batch* con respecto a los cultivos controles de microalgas y bacterias, independientemente de los porcentajes de microalgas y bacterias presentes en los inóculos.
2. La eliminación de contaminantes en los FBRs operados de manera cerrada, tanto con TRH de 6 como de 3 días, fue parcial, no alcanzándose concentraciones de descarga dentro de los límites más restrictivos marcados por la legislación (10-15 mg L⁻¹ para el NT y 125 mg L⁻¹ para la DQO). La baja eliminación de nitrógeno en los fotobiorreactores cerrados se debió a la ausencia de volatilización de NH₃.
3. Las condiciones generadas en los fotobiorreactores durante el proceso de depuración, como consecuencia del proceso fotosintético (OD y pH), resultaron ser determinantes en la selección de microorganismos, tanto eucariotas como procariotas. La alta concentración de oxígeno disuelto, y el elevado pH, promovieron la desaparición de los géneros de bacterias micro-aerobias dominantes del inóculo de fango activo. La dominancia en los consorcios de las microalgas, *Chlorella sorokiniana*, la escasez de bacterias heterótrofas y la dominancia de bacterias púrpuras fotótrfas (familia *Rhodobacteraceae*), no especializadas en la eliminación de materia orgánica, motivaron la baja eliminación de la fracción de DQO₅ total y biodegradable en los fotobiorreactores cerrados.
4. El modelo de producción/consumo de oxígeno propuesto es adecuado para predecir la actividad de los consorcios microalgas-bacterias. Mediante este modelo es posible predecir, con un elevado nivel de confianza, la producción de oxígeno de las microalgas durante el período de luz, el consumo de oxígeno bacteriano y la reducción de la velocidad de producción de oxígeno causado por la inhibición del mismo. Sin embargo, el modelo no puede predecir el consumo de oxígeno nocturno en los fotobiorreactores puesto que no tiene en cuenta el consumo de reservas energéticas durante el período de oscuridad.
5. En los reactores en los que se detectó la presencia de la microalga *Desmodesmus multivariabilis* y los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, independientemente del método de operación abierto o cerrado se encontraron los mejores porcentajes de eliminación de materia orgánica soluble (46-48%) y soluble

biodegradable (86-88%), obteniéndose concentraciones en la descarga en el límite legal más restrictivo.

6. La cantidad de nitrógeno asimilada por los microorganismos no se vio afectada por la operación de los fotobiorreactores en abierto o cerrado. Los valores de pH básicos provocaron que la mayor parte del N-NH_4^+ se encontrase en forma de N-NH_3 . En los reactores cerrados a la atmósfera, dada su estanqueidad, este N-NH_3 no pudo ser eliminado por volatilización. Este hecho causó que en términos generales la cantidad total de nitrógeno eliminada disminuyera. Sin embargo, la configuración abierta maximizó la eliminación de este elemento mediante la combinación de la asimilación biológica y volatilización mediada por los pH básicos alcanzados en el cultivo. La alimentación nocturna de influente no favoreció que se desarrollaran las condiciones mínimas necesarias para fomentar la nitrificación, prueba de ello fue la desaparición de géneros nitrificantes (como Nitrosomonas) de los reactores.
7. Las mejores eliminaciones de fósforo se obtuvieron en los ensayos con TRH de 3 d, superiores al 88%. Cabe destacar que la reducida concentración de este elemento en los influentes, independientemente del TRH empleado, contribuyó a la obtención de efluentes con bajas concentraciones de este compuesto.

5.1. Futuras líneas de investigación

A la vista de los resultados obtenidos, y con el objetivo de optimizar el proceso de depuración de las aguas residuales mediante la utilización de consorcios de microalgas-bacterias que conduzcan a la completa eliminación del nitrógeno y materia orgánica, el futuro trabajo se debería orientar a:

1. Identificación de las especies de microalgas y bacterias claves para la eliminación de materia orgánica y de los microorganismos que afectan negativamente el proceso de depuración a escala de laboratorio e industrial. Estudiar en profundidad las situaciones en las que los consorcios secretan SPE, analizar su naturaleza y su efecto en los parámetros de eliminación de materia orgánica.
2. Implementación de condiciones de operación que permitan la eliminación de nitrógeno por desnitrificación en los casos en los que no sea posible eliminar la totalidad del nitrógeno a través de la asimilación. A través de la alimentación nocturna de influente se podría suministrar el carbono inorgánico y materia orgánica necesarias para el desarrollo

de bacterias nitrificantes-desnitrificantes. Durante la noche, cuando los niveles de oxígeno disuelto son bajos (debido a la ausencia de actividad fotosintética), pero suficientes para la nitrificación, el aporte de CI podría favorecer el proceso. El aporte de materia orgánica en este período a su vez podría contribuir a fomentar la desnitrificación heterótrofa de reducción del nitrato a nitrógeno molecular.

3. Desarrollo de modelos de simulación capaces de predecir las caídas bruscas de la concentración de oxígeno durante los períodos de oscuridad del ciclo diario. Para ello, será necesario cuantificar las pérdidas de los materiales de reserva de los microorganismos durante los períodos de oscuridad y desarrollar modelos que correlacionen dichas pérdidas con la disminución en la concentración de oxígeno disuelto.

Referencias

Referencias

1. Asociación española de abastecimiento de agua y saneamiento. **Informe sobre aguas residuales en España**, Día mundial del agua 2017. Madrid, España: AEAE; 2017.
2. UNESCO World Water Assessment Programme. **The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource**. Perugia, Italia: UNESCO; 2017.
3. Cuellar-Bermudez SP, Aleman-Nava GS, Chandra R, Garcia-Perez JS, Contreras-Angulo JR, Markou G, Muylaert K, Rittmann BE, Parra-Saldivar R: **Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater**. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 2017, **24**:438-449.
4. **European Population Projections**. Eurostat-EU. 2018. <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=1&pcode=tps00002&language=en>. Último acceso 02 Jun 2019.
5. **Population connected to urban wastewater collecting and treatment systems, by treatment level**. Eurostat-EU. 2018. <http://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=1&pcode=ten00020&language=en>. Último acceso 02 Jun 2019.
6. Sato T, Qadir M, Yamamoto S, Endo T, Zahoor A: **Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use**. *Agricultural Water Management* 2013, **130**:1-13.
7. United Nations Environment Programme. **Economic valuation of wastewater: the cost of action and the cost of no action**. Nairobi, Kenia: UNEP; 2015.
8. Renuka N, Sood A, Ratha SK, Prasanna R, Ahluwalia AS: **Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production**. *Journal of Applied Phycology* 2013, **25**(5):1529-1537.
9. Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas. **Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible**. Nueva York, EE.UU: ONU; 2015.
10. **Generation and discharge of wastewater in volume**. Eurostat-EU. 2018. http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=env_ww_genv&lang=en. Último acceso 02 Jun 2019.

Referencias

11. Guldhe A, Kumari S, Ramanna L, Ramsundar P, Singh P, Rawat I, Bux F: **Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation.** *Journal Environmental Management* 2017, **203**:299-315.
12. Rawat I, Kumar RR, Mutanda T, Bux F: **Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production.** *Applied Energy* 2011, **88**(10):3411-3424.
13. Metcalf, Eddy, Burton FL, Stensel HD, Tsuchihashi R, Tchobanoglous G: **Wastewater engineering: treatment and reuse:** Denver, USA: *McGraw Hill*; 2014.
14. Henze M, Comeau Y: **Wastewater characterization.** In Henze M, van Loosdrecht M, Ekama G.A, Brdjanovic D, editors. *Biological wastewater treatment: Principles modelling and design.* IWA Publishing. London, UK; 2008. p. 33-52.
15. **Population change - Demographic balance and crude rates at national level.** Eurostat-EU. 2019. http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=demo_gind&. Último acceso 02 Jun 2019.
16. **Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.** Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 1991. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31991L0271&from>. Último acceso 02 Jun 2019.
17. **Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.** Boletín Oficial del Estado 1995. <https://www.boe.es/boe/dias/1995/12/30/pdfs/A37517-37519.pdf>. Último acceso 02 Jun 2019.
18. **Comunicado de prensa de la Comisión Europea.** Comisión Europea 2016. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-16-3645_es.htm. Último acceso 02 Jun 2019.
19. **European Comission Urban Wastewater Website: Spain.** European Comission. https://uwwtd.eu/Spain/uwwtps/compliance?field_anneedata_value=. Last accesos 02 jun 2019.
20. Rittmann BE, McCarty PL: **Environmental biotechnology: principles and applications:** New York, USA: *McGraw-Hill Education*; 2012.
21. Bodik I, Kubaska M: **Energy and sustainability of operation of a wastewater treatment plant.** *Environment Protection Engineering* 2013, **39**(2):15-24.
22. van Lier JB, Mahmoud N, Zeeman G: **Anaerobic wastewater treatment.** In Henze M, van Loosdrecht M, Ekama G.A, Brdjanovic D, editors. *Biological wastewater treatment: Principles modelling and design.* IWA Publishing. London, UK; 2008. p. 401-442.

Referencias

23. McGinn PJ, Dickinson KE, Bhatti S, Frigon J-C, Guiot SR, O'Leary SJB: **Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations.** *Photosynthesis Research* 2011, **109**(1-3):231-247.
24. Gómez-Serrano C, Morales-Amaral MM, Acién FG, Escudero R, Fernández-Sevilla JM, Molina-Grima E: **Utilization of secondary-treated wastewater for the production of freshwater microalgae.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015, **99**(16):6931-6944.
25. Sommers LE, Nelson DW, Yost KJ: **Variable nature of chemical composition of sewage sludges.** *Journal of Environmental Quality* 1976, **5**(3):303-306.
26. Boutchich GEK, Tahiri S, Mahi M, Gallart-Mateu D, de la Guardia M, Aarfane A, Lhadi EK, El Krati M: **Characterization of activated sludge from domestic sewage treatment plants and their management using composting and co-composting in aerobic silos.** *Journal of Materials and Environmental Science* 2015, **8**:2206-2220.
27. Halling-Sørensen B, Jørgensen SE: **The removal of nitrogen compounds from wastewater.** In *Studies in Environmental Science*. London, UK; Elsevier; 1993. vol. 54 p. 3-443.
28. Gray NF: **Water technology: IWA Publishing.** London, UK; 2010.
29. Longo S, d'Antoni BM, Bongards M, Chaparro A, Cronrath A, Fatone F, Lema JM, Mauricio-Iglesias M, Soares A, Hospido A: **Monitoring and diagnosis of energy consumption in wastewater treatment plants. A state of the art and proposals for improvement.** *Applied Energy* 2016, **179**:1251-1268.
30. Fundación Botín. **Análisis y evaluación de las relaciones entre el agua y la energía en España.**, Madrid, España: Fundación Marcelino Botín Santander; 2010.
31. **El sistema eléctrico español.** Red Eléctrica 2017. https://www.ree.es/sites/default/files/11_PUBLICACIONES/Documentos/InformesSistemaElectrico/2017/inf_sis_elec_ree_2017.pdf. Último acceso 02 Jun 2019.
32. Gu YF, Li Y, Li XY, Luo PZ, Wang HT, Wang X, Wu J, Li FT: **Energy self-sufficient wastewater treatment plants: feasibilities and challenges.** *8th International Conference on Applied Energy (Icae2016)* 2017, **105**:3741-3751.
33. Yang LB, Zeng SY, Chen JN, He MA, Yang W: **Operational energy performance assessment system of municipal wastewater treatment plants.** *Water Science and Technology* 2010, **62**(6):1361-1370.

Referencias

34. Chae K-J, Kang J: **Estimating the energy independence of a municipal wastewater treatment plant incorporating green energy resources.** *Energy Conversion and Management* 2013, **75**:664-672.
35. Nogueira R, Brito AG, Machado AP, Janknecht P, Salas JJ, Vera L, Martel G: **Economic and environmental assessment of small and decentralized wastewater treatment systems.** *Desalination and Water Treatment* 2009, **4**(1-3):16-21.
36. **Cifras oficiales de población resultantes de la revisión del Padrón municipal a 1 de enero.** Instituto Nacional de Estadística <https://www.ine.es/dynt3/inebase/es/index.html?padre=517&dh=1>. Último acceso 02 Jun 2019.
37. Mannina G, Ekama G, Caniani D, Cosenza A, Esposito G, Gori R, Garrido-Baserba M, Rosso D, Olsson G: **Greenhouse gases from wastewater treatment - A review of modelling tools.** *Science of the Total Environment* 2016, **551**:254-270.
38. Koutsou OP, Gatidou G, Stasinakis AS: **Domestic wastewater management in Greece: Greenhouse gas emissions estimation at country scale.** *Journal of Cleaner Production* 2018.
39. Flato G, Marotzke J, Abiodun B, Braconnot P, Chou SC, Collins WJ, Cox P, Driouech F, Emori S, Eyring V: **Evaluation of climate models. In: climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.** *Climate Change* 2013, **5**:741-866.
40. Muñoz R, Guieysse B: **Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review.** *Water Research* 2006, **40**(15):2799-2815.
41. González-Fernández C, Mahdy A, Ballesteros I, Ballesteros M: **Impact of temperature and photoperiod on anaerobic biodegradability of microalgae grown in urban wastewater.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 2016, **106**:16-23.
42. Parravicini V, Svandal K, Krampe J: **Greenhouse gas emissions from wastewater treatment plants.** *Energy Procedia* 2016, **97**:246-253.
43. **Inventario de emisiones de España de gases de efecto invernadero.** Ministerio de Agricultura y Pesca, alimentación y Medio Ambiente 2017. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/documentoresumen-geiespana-serie1990-2015_tcm30-378882.pdf. Último acceso 02 Jun 2019.
44. **Séptima Comunicación Nacional de España. Convenio Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático.** Ministerio de Agricultura y Pesca, alimentación y Medio Ambiente 2017. <https://www.miteco.gob.es/es/cambio->

- [climatico/publicaciones/publicaciones/7cn_web_tcm30-438294.pdf](#). Último acceso 02 Jun 2019.
45. Castell D, Ventoso MG, Fibla IT, Ferrer C, Martínez JJM, Borona IB, Basiero JA: **Optimización energética del sistema de aireación de una EDAR. Análisis comparativo de dos tecnologías.** *Tecnología del agua* 2011, **31**(327):50-56.
 46. Tiron O, Bumbac C, Patroescu IV, Badescu VR, Postolache C: **Granular activated algae for wastewater treatment.** *Water Science and Technology* 2015, **71**(6):832-839.
 47. De Godos I, Arbib Z, Lara E, Cano R, Muñoz R, Rogalla F: **Wastewater treatment in algal systems.** *Innovative Wastewater Treatment & Resource Recovery Technologies: Impacts on Energy, Economy and Environment* 2017:76.
 48. Hoh D, Watson S, Kan E: **Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: A review.** *Chemical Engineering Journal* 2016, **287**:466-473.
 49. Grobbelaar JU: **Algal Nutrition–Mineral Nutrition.** In Amos Richmond editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. *Blackwell Science*; Oxford, UK. 2004. p. 95-115.
 50. Carlsson AS: **Micro-and macro-algae: utility for industrial applications: outputs from the EPOBIO project:** CPL Press; 2007.
 51. Chisti Y: **Biodiesel from microalgae.** *Biotechnology Advances* 2007, **25**(3):294-306.
 52. Pires J, Alvim-Ferraz M, Martins F, Simões M: **Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture.** *Environmental Science and Pollution Research* 2013, **20**(8):5096-5105.
 53. Suganya T, Varman M, Masjuki HH, Renganathan S: **Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2016, **55**:909-941.
 54. Acién G, Molina-Grima E, Reis A, Torzillo G, Zittelli GC, Sepúlveda C, Masojídek J: **Photobioreactors for the production of microalgae.** In Cristina González-Fernández and Raúl Muñoz editors. Microalgae-based biofuels and bioproducts. London, UK; *Elsevier*; 2018: 1-44.
 55. Acién G, Sevilla JMF, Pérez JAS, Molina-Grima E, Chisti Y: **Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance.** *Chemical Engineering Science* 2001, **56**(8):2721-2732.
 56. Benemann J: **Microalgae for Biofuels and Animal Feeds.** *Energies* 2013, **6**(11):5869-5886.

Referencias

57. Alcántara C, Posadas E, Guieysse B, Muñoz R: **Microalgae-based wastewater treatment**. In Se-Kwon Kim editor. Handbook of marine microalgae. Boston, USA; *Elsevier*; 2015: 439-455.
58. Craggs R, Sutherland D, Campbell H: **Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production**. *Journal of Applied Phycology* 2012, **24**(3):329-337.
59. Posadas E, del Mar Morales M, Gómez C, Acien G, Muñoz R: **Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways**. *Chemical Engineering Journal* 2015, **265**:239-248.
60. Mendoza JL, Granados MR, de Godos I, Acien G, Molina-Grima E, Banks C, Heaven S: **Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production**. *Biomass Bioenergy* 2013, **54**:267-275.
61. Park JBK, Craggs RJ: **Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use**. *Water Science and Technology* 2011, **63**(10):2403-2410.
62. De Godos I, Blanco S, García-Encina PA, Becares E, Muñoz R: **Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates**. *Bioresource Technology* 2009, **100**(19):4332-4339.
63. Oswald WJ, Goleuke CG: **Large-scale production of algae**. *California University*, Berkeley, USA; 1967.
64. Mendoza JL, Granados MR, de Godos I, Acien G, Molina-Grima E, Heaven S, Banks CJ: **Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways**. *Bioresource Technology* 2013, **137**:188-195.
65. Sompech K, Chisti Y, Srinophakun T: **Design of raceway ponds for producing microalgae**. *Biofuels* 2012, **3**(4):387-397.
66. Liffman K, Paterson DA, Liovic P, Bandopadhyay P: **Comparing the energy efficiency of different high rate algal raceway pond designs using computational fluid dynamics**. *Chemical Engineering Research and Design* 2013, **91**(2):221-226.
67. Chiaramonti D, Prussi M, Casini D, Tredici MR, Rodolfi L, Bassi N, Zittelli GC, Bondioli P: **Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: re-thinking a traditional system is possible**. *Applied Energy* 2013, **102**:101-111.
68. de Godos I, Mendoza JL, Acien G, Molina-Grima E, Banks CJ, Heaven S, Rogalla F: **Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases**. *Bioresource Technology* 2014, **153**:307-314.

Referencias

69. Craggs R, Park J, Sutherland D, Heubeck S: **Economic construction and operation of hectare-scale wastewater treatment enhanced pond systems.** *Journal of Applied Phycology* 2015, **27**(5):1913-1922.
70. Arcila JS, Buitrón G: **Microalgae–bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability and methane potential.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2016, **91**(11):2862-2870.
71. Kim B-H, Kang Z, Ramanan R, Choi J-E, Cho D-H, Oh H-M, Kim H-S: **Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater.** *Journal of Microbiology & Biotechnology* 2014, **24**(8):1123-1132.
72. Kim S-K: **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances.** Boston, USA: Elsevier; 2015
73. Alcántara C, Fernández C, García-Encina PA, Muñoz R: **Mixotrophic metabolism of *Chlorella sorokiniana* and algal-bacterial consortia under extended dark-light periods and nutrient starvation.** *Applied Microbiology & Biotechnology* 2015, **99**(5):2393-2404.
74. Graham LE, Wilcox LW: **Algae–Prentice Hall.** Upper Saddle River, New Jersey 2000.
75. Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasad S, Banerjee UC: **Prospects of biodiesel production from microalgae in India.** *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2009, **13**(9):2361-2372.
76. Craggs RJ, Heubeck S, Lundquist TJ, Benemann JR: **Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds.** *Water Science and Technology* 2011, **63**(4):660-665.
77. Assemany PP, Calijuri ML, do Couto EdA, de Souza MHB, Silva NC, da Fonseca Santiago A, de Siqueira Castro J: **Algae/bacteria consortium in high rate ponds: influence of solar radiation on the phytoplankton community.** *Ecological Engineering* 2015, **77**:154-162.
78. Cho D-H, Ramanan R, Heo J, Kang Z, Kim B-H, Ahn C-Y, Oh H-M, Kim H-S: **Organic carbon, influent microbial diversity and temperature strongly influence algal diversity and biomass in raceway ponds treating raw municipal wastewater.** *Bioresource Technology* 2015, **191**:481-487.
79. Whitton BA, Potts M: **Introduction to the cyanobacteria.** In Whitton B, editor. *Ecology of Cyanobacteria II.* Dordrecht, Holland; Springer 2012 p. 1-13.
80. Markou G, Georgakakis D: **Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review.** *Applied Energy* 2011, **88**(10):3389-3401.
81. Allgaier M, Uphoff H, Felske A, Wagner-Dobler I: **Aerobic anoxygenic photosynthesis in Roseobacter clade bacteria from diverse marine habitats.** *Applied and Environmental Microbiology* 2003, **69**(9):5051-5059.

Referencias

82. Hiraishi A, Muramatsu K, Urata K: **Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1995, **79**(1):39-44.
83. Marín D, Posadas E, García D, Puyol D, Lebrero R, Muñoz R: **Assessing the potential of purple phototrophic bacteria for the simultaneous treatment of piggery wastewater and upgrading of biogas.** *Bioresource Technology* 2019, **281**:10-17.
84. Hülsen T, Barry EM, Lu Y, Puyol D, Keller J, Batstone DJ: **Domestic wastewater treatment with purple phototrophic bacteria using a novel continuous photo anaerobic membrane bioreactor.** *Water research* 2016, **100**:486-495.
85. Golomysova A, Gomelsky M, Ivanov PS: **Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production.** *International Journal of Hydrogen Energy* 2010, **35**(23):12751-12760.
86. Singh UB, Ahluwalia AS: **Microalgae: a promising tool for carbon sequestration.** *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 2013, **18**(1):73-95.
87. González-Fernández C, Méndez L, Ballesteros M, Tomás-Pejó E: **Hydrothermal Processing of Microalgae.** In Ruiz HA, Thomsen M, Trajano HL, editors. *Hydrothermal Processing in Biorefineries*. Berlin, Heidelberg Germany; *Springer*; 2017. p. 483-500.
88. Kröger M, Müller-Langer F: **Review on possible algal-biofuel production processes.** *Biofuels* 2012, **3**(3):333-349.
89. Babatsouli P, Fodelianakis S, Paranychianakis N, Venieri D, Dialynas M, Kalogerakis N: **Single stage treatment of saline wastewater with marine bacterial-microalgae consortia in a fixed-bed photobioreactor.** *Journal of Hazardous Materials* 2015, **292**:155-163.
90. Azcón-Bieto J, Talón M: **Fundamentos de fisiología vegetal.** *McGraw-Hill Interamericana* Madrid, España; 2008.
91. Béchet Q, Shilton A, Guieysse B: **Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation.** *Biotechnology advances* 2013, **31**(8):1648-1663.
92. Markou G, Vandamme D, Muylaert K: **Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients.** *Water Research* 2014, **65**:186-202.
93. Sutherland DL, Howard-Williams C, Turnbull MH, Broady PA, Craggs RJ: **Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production.** *Bioresource Technology* 2015, **184**:222-229.

Referencias

94. Barreiro-Vescovo S, de Godos I, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, González-Fernández C: **Effect of microalgae storage conditions on methane yields.** *Environmental Science and Pollution Research* 2018;1-8.
95. González-Fernández C, Barreiro-Vescovo S, de Godos I, Fernández M, Zouhayr A, Ballesteros M: **Biochemical methane potential of microalgae biomass using different microbial inocula.** *Biotechnology Biofuels* 2018, **11**(1):184.
96. Pérez-García O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y: **Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products.** *Water Research* 2011, **45**(1):11-36.
97. Cai T, Park SY, Li YB: **Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects.** *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2013, **19**:360-369.
98. González-Fernández C, Molinuevo-Salces B, García-González MC: **Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry.** *Bioresource Technology* 2011, **102**(2):960-966.
99. García J, Mujeriego R, Hernández-Mariné M: **High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal.** *Journal of Applied Phycology* 2000, **12**(3):331-339.
100. Collos Y, Harrison PJ: **Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae.** *Marine Pollution Bulletin* 2014, **80**(1-2):8-23.
101. Acién FG, Gomez-Serrano C, Morales-Amaral MM, Fernandez-Sevilla JM, Molina-Grima E: **Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016, **100**(21):9013-9022.
102. Powell N, Shilton AN, Pratt S, Chisti Y: **Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds.** *Environmental Science & Technology* 2008, **42**(16):5958-5962.
103. Larsdotter K, Jansen JLC, Dalhammar G: **Biologically mediated phosphorus precipitation in wastewater treatment with microalgae.** *Environmental technology* 2007, **28**(9):953-960.
104. Larsdotter K: **Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate.** Doctoral dissertation. KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden; 2006.
105. Mehrabadi A, Craggs R, Farid MM: **Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production.** *Bioresource technology* 2015, **184**:202-214.
106. Arbib Z, Ruiz J, Álvarez-Díaz P, Garrido-Pérez C, Barragan J, Perales JA: **Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater.** *Ecological Engineering* 2013, **52**:143-153.

Referencias

107. Larsdotter K: **Wastewater treatment with microalgae-a literature review**. *Vatten* 2006, **62**(1):31.
108. Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN: **Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond**. *Water Research* 2011, **45**(20):6637-6649.
109. Massimi R, Kirkwood AE: **Screening microalgae isolated from urban storm-and wastewater systems as feedstock for biofuel**. *PeerJ* 2016, **4**:2396.
110. Sydney EBd, Da Silva TE, Tokarski A, Novak ACd, De Carvalho JC, Woiciechowski AL, Larroche C, Soccol CR: **Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage**. *Applied Energy* 2011, **88**(10):3291-3294.
111. Ras M, Steyer JP, Bernard O: **Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production**. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2013, **12**(2):153-164.
112. Singh SP, Singh P: **Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review**. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2015, **50**:431-444.
113. Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M: **Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production**. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2009, **48**(6):1146-1151.
114. Cho SH, Ji S-C, Hur SB, Bae J, Park I-S, Song Y-C: **Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata***. *Fisheries Science* 2007, **73**(5):1050-1056.
115. Daliry S, Hallajani A, Mohammadi Roshandeh J, Nouri H, Golzary A: **Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth**. *Global Journal of Environmental Science and Management* 2017, **3**(2):217-230.
116. Falkowski PG: **Light-shade adaptation in marine phytoplankton**. In Falkowski PG, editor. *Primary productivity in the sea*. Boston, USA; *Springer*; 1980. p. 99-119.
117. Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ: **Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis**. *Plant Physiology* 2004, **120**(2):179-186.
118. Béchet Q, Shilton A, Fringer OB, Muñoz R, Guieysse B: **Mechanistic modeling of broth temperature in outdoor photobioreactors**. *Environmental Science & Technology* 2010, **44**(6):2197-2203.

Referencias

119. Béchet Q, Shilton A, Park JBK, Craggs RJ, Guieysse B: **Universal temperature model for shallow algal ponds provides improved accuracy.** *Environmental Science & Technology* 2011, **45**(8):3702-3709.
120. Alcántara C, Domínguez JM, García D, Blanco S, Pérez R, García-Encina PA, Muñoz R: **Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic–aerobic algal–bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances.** *Bioresource technology* 2015, **191**:173-186.
121. Sutherland DL, Howard-Williams C, Turnbull MH, Broady PA, Craggs RJ: **Seasonal variation in light utilisation, biomass production and nutrient removal by wastewater microalgae in a full-scale high-rate algal pond.** *Journal of Applied Phycology* 2014, **26**(3):1317-1329.
122. Molina-Grima E, Camacho FG, Pérez JA, Sevilla JM, Fernandez FG, Gomez AC: **A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1994, **61**(2):167-173.
123. Blanken W, Postma PR, de Winter L, Wijffels RH, Janssen M: **Predicting microalgae growth.** *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 2016, **14**:28-38.
124. Jassby AD, Platt T: **Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton.** *Limnology and Oceanography* 1976, **21**(4):540-547.
125. Ragonese FP, Williams JA: **A mathematical model for the batch reactor kinetics of algae growth.** *Biotechnology and Bioengineering* 1968, **10**(1):83-88.
126. Aiba S: **Growth kinetics of photosynthetic microorganisms.** *Microbial Reactions* 1982:85-156.
127. Ryther JH: **Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity.** *Limnology and Oceanography* 1956, **1**(1):61-70.
128. Huesemann M, Crowe B, Waller P, Chavis A, Hobbs S, Edmundson S, Wigmosta M: **A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures.** *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 2016, **13**:195-206.
129. Eckardt NA: **Photorespiration revisited.** In.: American Society of Plant Biologists; 2005.
130. Kliphuis AMJ, Janssen M, van den End EJ, Martens DE, Wijffels RH: **Light respiration in *Chlorella sorokiniana*.** *Journal of Applied Phycology* 2011, **23**(6):935-947.
131. Ogawa T, Fujii T, Aiba S: **Effect of oxygen on the growth (yield) of *Chlorella vulgaris*.** *Archives of Microbiology* 1980, **127**(1):25-31.

Referencias

132. Shelp BJ, Canvin DT: **Photorespiration and oxygen inhibition of photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa***. *Plant Physiology* 1980, **65**(5):780-784.
133. Märkl H, & Mather, M.: **Mixing and aeration of shallow open ponds**. *Archiv Für Hydrobiologie* 1985, **20**:85-93.
134. Costache TA, Acién G, Morales MM, Fernández-Sevilla JM, Stamatini I, Molina-Grima E: **Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, **97**(17):7627.
135. Márquez FJ, Sasaki K, Nishio N, Nagai S: **Inhibitory effect of oxygen accumulation on the growth of *Spirulina platensis***. *Biotechnology Letters* 1995, **17**(2):225-228.
136. Arbib Z, Crespo ID, Corona EL, Rogalla F: **Understanding the biological activity of high rate algae ponds through the calculation of oxygen balances**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017, **101**(12):5189-5198.
137. Evans RA, Fallowfield HJ, Cromar NJ: **Characterisation of oxygen dynamics within a high-rate algal pond system used to treat abattoir wastewater**. *Water Science and Technology* 2003, **48**(2):61-68.
138. Jeon YC, Cho CW, Yun YS: **Oxygen evolution rate of photosynthetic microalga *Haematococcus pluvialis* depending on light intensity and quality**. *Studies in Surface Science and Catalysis* 2006, **159**:157-160.
139. Grobbelaar JU, Soeder CJ, Groeneweg J, Stengel E, Hartig P: **Rates of biogenic oxygen production in mass cultures of microalgae, absorption of atmospheric oxygen and oxygen availability for wastewater treatment**. *Water Research* 1988, **22**(11):1459-1464.
140. Huntley ME, Redalje DG: **CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal**. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 2007, **12**(4):573-608.
141. Belay A: **Mass culture of *Spirulina* outdoors—the earthrise farms experience**. In Vonshak A, editor. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-Biology and biotechnology*. Tylor & Francis Group. London, UK; 1997:131-158.
142. Choudhary P, Prajapati SK, Malik A: **Screening native microalgal consortia for biomass production and nutrient removal from rural wastewaters for bioenergy applications**. *Ecological Engineering* 2016, **91**:221-230.
143. Ramanan R, Kim B-H, Cho D-H, Oh H-M, Kim H-S: **Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications**. *Biotechnology Advances* 2016, **34**(1):14-29.

Referencias

144. Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M: **Wastewater polishing by consortia of *Chlorella vulgaris* and activated sludge native bacteria**. *Journal of Cleaner Production* 2016, **133**:348-357.
145. Oswald W, Gotass H: **Photosynthesis in sewage treatment**. *Transactions of the American Society of Civil Engineers* 1957, **122**:73–105.
146. Fuentes JL, Garbayo I, Cuaresma M, Montero Z, Gonzalez-del-Valle M, Vilchez C: **Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds**. *Marine Drugs* 2016, **14**(5).
147. Wang X, Li ZJ, Su JQ, Tian Y, Ning XR, Hong HS, Zheng TL: **Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere**. *Biological Control* 2010, **52**(2):123-130.
148. Pratt R, Daniels TC, Eiler JJ, Gunnison JB, Kumler WD, Oneto JF, Strait LA, Spoehr HA, Hardin GJ, Milner EW *et al*: **Chlorellin an antibacterial substance from *Chlorella***. *Science* 1944, **99**(2574):351-352.
149. de-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y: **Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris***. *Journal of Phycology* 2008, **44**(4):938-947.
150. Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R: **Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential**. *Biotechnology Advances* 2011, **29**(6):896-907.
151. Kazamia E, Czesnick H, Thi TVN, Croft MT, Sherwood E, Sasso S, Hodson SJ, Warren MJ, Smith AG: **Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation**. *Environmental Microbiology* 2012, **14**(6):1466-1476.
152. Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG: **Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria**. *Nature* 2005, **438**(7064):90-93.
153. Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M: **A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment**. *Algal Research* 2017, **24**:403-415.
154. Unnithan VV, Unc A, Smith GB: **Mini-review: A priori considerations for bacteria-algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters**. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 2014, **4**:35-40.
155. Foladori P, Petrini S, Andreottola G: **Evolution of real municipal wastewater treatment in photobioreactors and microalgae-bacteria consortia using real-time parameters**. *Chemical Engineering Journal* 2018, **345**:507-516.

Referencias

156. Liang Z, Liu Y, Ge F, Xu Y, Tao N, Peng F, Wong M: **Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis***. *Chemosphere* 2013, **92**(10):1383-1389.
157. Mujtaba G, Rizwan M, Lee K: **Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris***. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2017, **49**:145-151.
158. Hernandez D, Riano B, Coca M, Garcia-Gonzalez MC: **Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae-bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass**. *Bioresource Technology* 2013, **135**:598-603.
159. Su Y, Mennerich A, Urban B: **Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios**. *Bioresource Technology* 2012, **105**:67-73.
160. He PJ, Mao B, Lü F, Shao LM, Lee DJ, Chang JS: **The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters**. *Bioresource Technology* 2013, **146**:562-568.
161. Wang L, Liu J, Zhao Q, Wei W, Sun Y: **Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems**. *Bioresource Technology* 2016, **211**:1-5.
162. Li B, Wu G: **Effects of sludge retention times on nutrient removal and nitrous oxide emission in biological nutrient removal processes**. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2014, **11**(4):3553-3569.
163. De Godos I, Vargas VA, Guzmán HO, Soto R, García B, García PA, Muñoz R: **Assessing carbon and nitrogen removal in a novel anoxic-aerobic cyanobacterial-bacterial photobioreactor configuration with enhanced biomass sedimentation**. *Water Research* 2014, **61**:77-85.
164. Lakaniemi AM, Intihar VM, Tuovinen OH, Puhakka JA: **Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors**. *Microbial Biotechnology* 2012, **5**(1):69-78.
165. Ferrero EM, de Godos I, Rodríguez EM, García-Encina PA, Muñoz R, Bécares E: **Molecular characterization of bacterial communities in algal-bacterial photobioreactors treating piggery wastewaters**. *Ecological Engineering* 2012, **40**:121-130.
166. Fulbright SP, Robbins-Pianka A, Berg-Lyons D, Knight R, Reardon KF, Chisholm ST: **Bacterial community changes in an industrial algae production system**. *Algal Research* 2018, **31**:147-156.

Referencias

167. Garcia J, Hernandez-Marine M, Mujeriego R: **Influence of phytoplankton composition on biomass removal from high-rate oxidation lagoons by means of sedimentation and spontaneous flocculation.** *Water Environment Research* 2000, **72**(2):230-237.
168. Wang XH, Hu M, Xia Y, Wen XH, Ding K: **Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China.** *Applied and Environmental Microbiology* 2012, **78**(19):7042-7047.
169. Togarcheti SC, Mediboyina Mk, Chauhan VS, Mukherji S, Ravi S, Mudliar SN: **Life cycle assessment of microalgae based biodiesel production to evaluate the impact of biomass productivity and energy source.** *Resources, Conservation and Recycling* 2017, **122**:286-294.
170. Islam MA, Heimann K, Brown RJ: **Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2017, **79**:1160-1170.
171. Gouveia L: **Microalgae as a feedstock for biofuels:** Berlin, Heidelberg, Germany; Springer; 2011: 1-69.
172. Molinuevo-Salces B, Mahdy A, Ballesteros M, González-Fernández C: **From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion.** *Renewable Energy* 2016, **96, Part B**:1103-1110.
173. López EN, Medina AR, Moreno PAG, Cerdán LE, Grima EM: **Extraction of microalgal lipids and the influence of polar lipids on biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification.** *Bioresource Technology* 2016, **216**:904-913.
174. Lardon L, Helias A, Sialve B, Steyer JP, Bernard O: **Life-Cycle assessment of biodiesel production from microalgae.** *Environmental Science & Technology* 2009, **43**(17):6475-6481.
175. Ho SH, Huang SW, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A, Chang JS: **Bioethanol production, using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.** *Bioresource Technology* 2013, **135**:191-198.
176. Ho SH, Li PJ, Liu CC, Chang JS: **Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N.** *Bioresource Technology* 2013, **145**:142-149.
177. Lam MK, Lee KT: **Bioethanol Production from Microalgae A2,**. In Se-Kwon Kim editor. Handbook of Marine Microalgae. Boston, USA; Elsevier; 2015: 197-208.
178. Kim KH, Choi IS, Kim HM, Wi SG, Bae HJ: **Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation.** *Bioresource Technology* 2014, **153**:47-54.

Referencias

179. Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK: **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products**. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2010, **14**(3):1037-1047.
180. Sui ZQ, Gizaw Y, BeMiller JN: **Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella***. *Carbohydrate Polymers* 2012, **90**(1):1-7.
181. Gonzalez-Fernandez C, Sialve B, Molinuevo-Salces B: **Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs**. *Bioresource Technology* 2015, **198**:896-906.
182. Pilli S, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY: **Thermal pretreatment of sewage sludge to enhance anaerobic digestion: a review**. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2015, **45**(6):669-702.
183. Valo A, Carrere H, Delgenes JP: **Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion**. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* 2004, **79**(11):1197-1203.
184. González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP: **Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production**. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2012, **6**(2):205-218.
185. Carrerea H, Raftafi Y, Battimelli A, Torrijos M, Delgenès J-P, Ruysschaert G: **Methane potential of waste activated sludge and fatty residues: Impact of codigestion and alkaline pretreatments**. *Open Environmental Engineering Journal* 2010, **3**:71-76.
186. Carrère H, Dumas C, Battimelli A, Batstone DJ, Delgenès JP, Steyer JP, Ferrer I: **Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review**. *Journal of Hazardous Materials* 2010, **183**(1-3):1-15.
187. Wang M, Park C: **Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge**. *Biomass and Bioenergy* 2015, **80**:30-37.
188. Mahdy A, Méndez L, Tomás-Pejó E, del Mar Morales M, Ballesteros M, González-Fernández C: **Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2016, **91**(5):1299-1305.
189. Mahdy A, Méndez L, Ballesteros M, González-Fernández C: **Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production**. *Energy* 2014, **78**:48-52.

Referencias

190. Méndez L, Mahdy A, Ballesteros M, González-Fernández C: **Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp biomass at increasing biomass loads.** *Applied Energy* 2014, **129**:238-242.
191. Mahdy A, Méndez L, Ballesteros M, González-Fernández C: **Algaculture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass.** *Bioresource Technology* 2015, **184**:236-244.
192. Park S, Li Y: **Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste.** *Bioresource Technology* 2012, **111**:42-48.
193. Mahdy A, Fotidis IA, Mancini E, Ballesteros M, González-Fernández C, Angelidaki I: **Ammonia tolerant inocula provide a good base for anaerobic digestion of microalgae in third generation biogas process.** *Bioresource Technology* 2017, **225**:272-278.
194. Nichols HW: **Growth media-freshwater.** *Culture methods and growth measurements* 1973:7-24.
195. Park JK, Wang J, Novotny G: **Wastewater characterization for evaluation of biological phosphorus removal,** *Wisconsin Department of Natural Resources*; 1997 **174**.
196. Federation WE, American Public Health A: **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington, DC, USA: *American Public Health Association (APHA)*; 2005.
197. Kjeldahl J: **Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern.** *Zeitschrift für analytische Chemie* 1883, **22**(1):366-382.
198. Hansen KH, Angelidaki I, Ahring BK: **Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia.** *Water Research* 1998, **32**(1):5-12.
199. Molina-Grima EM, Sevilla JMF, Pérez JAS, Camacho FG: **A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances.** *Journal of Biotechnology* 1996, **45**(1):59-69.
200. Ippoliti D, Gómez C, del Mar Morales-Amaral M, Pistocchi R, Fernández-Sevilla JM, Acien FG: **Modeling of photosynthesis and respiration rate for *Isochrysis galbana* (T-Iso) and its influence on the production of this strain.** *Bioresource Technology* 2016, **203**:71-79.
201. Díez B, Pedrós-Alió C, Marsh TL, Massana R: **Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques.** *Applied and Environmental Microbiology* 2001, **67**(7):2942-2951.

202. Lim J, Lee S, Hwang S: **Use of quantitative real-time PCR to monitor population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in batch process.** *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2008, **35**(11):1339-1344.
203. Boon N, De Windt W, Verstraete W, Top EM: **Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants.** *FEMS Microbiology Ecology* 2002, **39**(2):101-112.
204. Shchegolkova NM, Krasnov GS, Belova AA, Dmitriev AA, Kharitonov SL, Klimina KM, Melnikova NV, Kudryavtseva AV: **Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions.** *Frontiers in Microbiology* 2016, **7**:15.
205. Fredriksson NJ, Hermansson M, Wilén B-M: **Diversity and dynamics of Archaea in an activated sludge wastewater treatment plant.** *BMC microbiology* 2012, **12**(1):140.
206. Wang XH, Hu M, Xia Y, Wen XH, Ding K: **Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China.** *Applied and Environmental Microbiology* 2012, **78**(19):7042-7047.
207. Xu S, Yao J, Ainiwaer M, Hong Y, Zhang Y: **Analysis of Bacterial Community Structure of Activated Sludge from Wastewater Treatment Plants in Winter.** *BioMed Research International* 2018, **2018**.
208. Cho HU, Kim YM, Choi YN, Kim HG, Park JM: **Influence of temperature on volatile fatty acid production and microbial community structure during anaerobic fermentation of microalgae.** *Bioresource Technology* 2015, **191**:475-480.
209. Robertson BR, Button DK: **Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry.** *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 1989, **10**(1):70-76.
210. Marie D, Shi XL, Rigaut-Jalabert F, Vaultot D: **Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel.** *FEMS Microbiology Ecology* 2010, **72**(2):165-178.
211. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Gloeckner FO: **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.** *Nucleic Acids Research* 2013, **41**(1).
212. Pla L: **Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza.** *Interciencia* 2006, **31**(8):583-590.
213. Quijano G, Arcila JS, Buitron G: **Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment.** *Biotechnology Advances* 2017, **35**(6):772-781.

Referencias

214. Mezhoud N, Zili F, Bouzidi N, Helaoui F, Ammar J, Ouada HB: **The effects of temperature and light intensity on growth, reproduction and EPS synthesis of a thermophilic strain related to the genus *Graesiella***. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2014, **37**(11):2271-2280.
215. Shen Y, Fan Z, Chen C, Xu X: **An auto-flocculation strategy for *Chlorella vulgaris***. *Biotechnology Letters* 2015, **37**(1):75-80.
216. Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R: **Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, **162**(4):1174-1186.
217. Sánchez JF, Fernández JM, Ación FG, Rueda A, Pérez-Parra J, Molina-Grima E: **Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis***. *Process Biochemistry* 2008, **43**(4):398-405.
218. de Godos I, Vargas VA, Blanco S, González MCG, Soto R, García-Encina PA, Becares E, Muñoz R: **A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation**. *Bioresource Technology* 2010, **101**(14):5150-5158.
219. Abdelaziz AEM, Leite GB, Belhaj MA, Hallenbeck PC: **Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production**. *Bioresource Technology* 2014, **157**:140-148.
220. Foladori P, Petrini S, Nessenzia M, Andreottola G: **Enhanced nitrogen removal and energy saving in a microalgal–bacterial consortium treating real municipal wastewater**. *Water Science and Technology* 2018, **78**(1):174-182.
221. Wang L, Wang Y, Chen P, Ruan R: **Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, **162**(8):2324-2332.
222. Wang M, Kuo-Dahab WC, Dolan S, Park C: **Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment**. *Bioresource Technology* 2014, **154**:131-137.
223. Grunditz C, Dalhammar G: **Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter***. *Water Research* 2001, **35**(2):433-440.
224. Choi O, Das A, Yu CP, Hu Z: **Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and cyanobacteria**. *Biotechnology and Bioengineering* 2010, **107**(6):1004-1011.
225. Beydeş H, Karapinar I: **Algal nutrient removal from wastewater in fed-batch operated photobioreactor**. *International Journal of Environmental Research* 2018, **12**(3):303-311.

Referencias

226. Anbalagan A, Schwede S, Lindberg C-F, Nehrenheim E: **Influence of hydraulic retention time on indigenous microalgae and activated sludge process.** *Water Research* 2016, **91**:277-284.
227. Passos F, Gutiérrez R, Brockmann D, Steyer J-P, García J, Ferrer I: **Microalgae production in wastewater treatment systems, anaerobic digestion and modelling using ADM1.** *Algal Research* 2015, **10**:55-63.
228. Méndez L, Sialve B, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Steyer JP, González-Fernández C: **Comparison of *Chlorella vulgaris* and cyanobacterial biomass: cultivation in urban wastewater and methane production.** *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2016, **39**(5):703-712..
229. Arbib Z, de Godos I, Ruiz J, Perales JA: **Optimization of pilot high rate algal ponds for simultaneous nutrient removal and lipids production.** *Science of the Total Environment* 2017, **589**:66-72.
230. Woertz I, Feffer A, Lundquist T, Nelson Y: **Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock.** *Journal of Environmental Engineering* 2009, **135**(11):1115-1122.
231. de Godos I, Arbib Z, Lara E, Rogalla F: **Evaluation of High Rate Algae Ponds for treatment of anaerobically digested wastewater: Effect of CO₂ addition and modification of dilution rate.** *Bioresource Technology* 2016, **220**:253-261.
232. Goldman JC, Graham SJ: **Inorganic carbon limitation and chemical composition of two freshwater green microalgae.** *Applied and Environmental Microbiology* 1981, **41**(1):60-70.
233. Lee J, Cho DH, Ramanan R, Kim BH, Oh HM, Kim HS: **Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*.** *Bioresource Technology* 2013, **131**:195-201.
234. Neilson JW, Jordan FL, Maier RM: **Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis.** *Journal of Microbiological Methods* 2013, **92**(3):256-263.
235. Sosik HM, Olson RJ: **Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry.** *Limnology and Oceanography-Methods* 2007, **5**:204-216.
236. Hyka P, Lickova S, Pribyl P, Melzoch K, Kovar K: **Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae.** *Biotechnology Advances* 2013, **31**(1):2-16.
237. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rossello-Mora R: **Uniting the classification of cultured and uncultured**

- bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences.** *Nature Reviews Microbiology* 2014, **12**:635-645.
238. Posadas E, García-Encina PA, Domínguez A, Díaz I, Becares E, Blanco S, Muñoz R: **Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater.** *Ecological Engineering* 2014, **67**:156-164.
239. Limayem A, Micciche A, Nayak B, Mohapatra S: **Prokaryotic community profiling of local algae wastewaters using advanced 16S rRNA gene sequencing.** *Environmental Science and Pollution Research* 2018, **25**(1):704-711.
240. Gupta SK, Ansari FA, Shrivastava A, Sahoo NK, Rawat I, Bux F: **Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels.** *Journal of Cleaner Production* 2016, **115**:255-264
241. Ramsundar P, Guldhe A, Singh P, Bux F: **Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation.** *Bioresource Technology* 2017, **227**:82-92.
242. Vergara C, Muñoz R, Campos JL, Seeger M, Jeison D: **Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 2016, **114**:116-121.
243. Zheng Y, Li T, Yu X, Bates PD, Dong T, Chen S: **High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production.** *Applied energy* 2013, **108**:281-287.
244. Muñoz R, Jacinto M, Guieysse B, Mattiasson B: **Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal–bacterial bioreactors.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, **67**(5):699-707.
245. Ogbonna JC, Yoshizawa H, Tanaka H: **Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms.** *Journal of Applied Phycology* 2000, **12**(3-5):277-284.
246. McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreishcheva EN, Sogin ML: **Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent.** *Environmental Microbiology* 2010, **12**(2):378-392.
247. Cydzik-Kwiatkowska A, Zielinska M: **Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2016, **32**(4):8
248. Dworkin M: **The Prokaryotes: Vol. 7: *Proteobacteria*: delta and epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria:** Boston, USA; Springer; 2006.

Referencias

249. Thomas F, Hehemann J-H, Rebuffet E, Czek M, Michel G: **Environmental and Gut *Bacteroidetes*: The Food Connection**. *Frontiers in Microbiology* 2011, **2**:93.
250. Riffel A, Brandelli A: **Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002, **29**(5):255-258.
251. Bernardet JF, Bowman JP: **The Genus *Flavobacterium***. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The Prokaryotes Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*. Boston, USA; Springer; 2015 p. 481-531.
252. An DS, Im WT, Yang HC, Lee ST: ***Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, **56**(2):443-448.
253. Rosselló-Mora RA, Wagner M, Amann R, Schleifer K-H: **The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants**. *Applied and Environmental Microbiology* 1995, **61**(2):702-707.
254. Belila A, Fazaa I, Hassen A, Ghrabi A: **Anoxygenic phototrophic bacterial diversity within wastewater stabilization plant during 'red water' phenomenon**. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2013, **10**(4):837-846.
255. Buchan A, González JM, Moran MA: **Overview of the marine *Roseobacter* lineage**. *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(10):5665-5677.
256. Ye L, Zhang T: **Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, **97**(6):2681-2690.
257. Lu X, Zhang XX, Wang Z, Huang KL, Wang Y, Liang WG, Tan YF, Liu B, Tang JY: **Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing**. *Plos One* 2015, **10**(5).
258. Craggs RJ, Zwart A, Nagels JW, Davies-Colley RJ: **Modelling sunlight disinfection in a high rate pond**. *Ecological Engineering* 2004, **22**(2):113-122.
259. Weissman JC, Goebel RP, Benemann JR: **Photobioreactor design-mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation**. *Biotechnology and Bioengineering* 1988, **31**(4):336-344.
260. Grobbelaar JU, Soeder CJ: **Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds**. *Journal of Plankton Research* 1985, **7**(4):497-506.

261. Lowrey J, Brooks MS, McGinn PJ: **Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review.** *Journal of applied phycology* 2015, **27**(4):1485-1498.
262. Turon V, Baroukh C, Trably E, Latrille E, Fouilland E, Steyer JP: **Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics.** *Bioresource technology* 2015, **175**:342-349.
263. Béchet Q, Chambonnière P, Shilton A, Guizard G, Guieysse B: **Algal productivity modeling: A step toward accurate assessments of full-scale algal cultivation.** *Biotechnology and Bioengineering* 2015, **112**(5):987-996..
264. Acién G, García F, Sánchez J, Fernández JM, Molina-Grima E: **Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance.** *Biotechnology and Bioengineering* 1998, **58**(6):605-616.
265. García F, Acién G, Sánchez J, García F, Molina-Grima E: **Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture.** *Biotechnology and Bioengineering* 1999, **62**(1):71-86.
266. Richmond, A. **Large scale microalgal culture and applications.** *Progress in Phycological Research* 1990, **7**:1-62.
267. Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR: **Photorespiration: players, partners and origin.** *Trends in Plant Science* 2010, **15**(6):330-336.
268. Maurino VG, Peterhansel C: **Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering.** *Current Opinion in Plant Biology* 2010, **13**(3):248-255.
269. Posadas E, Serejo ML, Blanco S, Pérez R, García-Encina PA, Muñoz R: **Minimization of biomethane oxygen concentration during biogas upgrading in algal–bacterial photobioreactors.** *Algal Research* 2015, **12**:221-229.
270. Komolafe O, Orta SBV, Monje-Ramirez I, Noguez IY, Harvey AP, Ledesma MTO: **Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater.** *Bioresource Technology* 2014, **154**:297-304.
271. Luo LZ, Shao Y, Luo S, Zeng FJ, Tian GM: **Nutrient removal from piggery wastewater by *Desmodesmus* sp. CHX1 and its cultivation conditions optimization.** *Environmental Technology* 2018:1-8.
272. Ji F, Liu Y, Hao R, Li G, Zhou Y, Dong R: **Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater.** *Bioresource Technology* 2014, **161**:200-207.

Referencias

273. Birungi ZS, Chirwa EMN: **The kinetics of uptake and recovery of lanthanum using freshwater algae as biosorbents: Comparative analysis.** *Bioresource Technology* 2014, **160**:43-51.
274. Birungi ZS, Chirwa EMN, Botai OJ: **Competitive adsorption in a ternary system of toxic metals and rare earth elements using *Desmodesmus multivariabilis*: empirical and kinetic modelling.** *Journal of Applied Phycology* 2017, **29**(6):2899-2910.
275. Louca S, Doebeli M, Parfrey LW: **Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem.** *Microbiome* 2018, **6**(1):41.
276. Kembel SW, Wu M, Eisen JA, Green JL: **Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance.** *PLoS Computational Biology* 2012, **8**(10):e1002743.
277. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Thurber RLV, Knight R: **Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences.** *Nature Biotechnology* 2013, **31**(9):814.
278. Maza-Márquez P, González-Martínez A, Rodelas B, González-López J: **Full-scale photobioreactor for biotreatment of olive washing water: Structure and diversity of the microalgae-bacteria consortium.** *Bioresource Technology* 2017, **238**:389-398.
279. He Q, Chen L, Zhang S, Chen R, Wang H, Zhang W, Song J: **Natural sunlight induced rapid formation of water-born algal-bacterial granules in an aerobic bacterial granular photo-sequencing batch reactor.** *Journal of Hazardous Materials* 2018, **359**:222-230.
280. Carney LT, Reinsch SS, Lane PD, Solberg OD, Jansen LS, Williams KP, Trent JD, Lane TW: **Microbiome analysis of a microalgal mass culture growing in municipal wastewater in a prototype OMEGA photobioreactor.** *Algal Research* 2014, **4**:52-61.
281. Krohn-Molt I, Wemheuer B, Alawi M, Poehlein A, Güllert S, Schmeisser C, Pommerening-Röser A, Grundhoff A, Daniel R, Hanelt D: **Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors.** *Applied and Environmental Microbiology* 2013, **79**(20):6196-6206.
282. Su Y, Mennerich A, Urban B: **Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture.** *Water Research* 2011, **45**(11):3351-3358.
283. Sanz JL, Rojas P, Morato A, Mendez L, Ballesteros M, González-Fernández C: **Microbial communities of biomethanization digesters fed with raw and heat pre-treated microalgae biomasses.** *Chemosphere* 2017, **168**:1013-1021.

Referencias

284. Carretero LMC, Marcondes de Souza JA, de Mello Varani A, de Macedo Lemos EG: **The family *Rhizobiaceae***. In Rosenberg, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Boston, USA; Springer; 2014: 135-154.
285. Glaeser SP, Kämpfer P: **The family *Sphingomonadaceae***. In Rosenberg, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Boston, USA; Springer; 2014: p. 641-707.
286. Biondi N, Cheloni G, Tatti E, Decorosi F, Rodolfi L, Giovannetti L, Viti C, Tredici MR: **The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures**. *Journal of Applied Phycology* 2017, **29**(1):67-78.
287. Surkatti R, El-Naas MH: **Biological treatment of wastewater contaminated with p-cresol using *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel**. *Journal of Water Process Engineering* 2014, **1**:84-90.
288. Mujtaba G, Rizwan M, Lee K: **Simultaneous removal of inorganic nutrients and organic carbon by symbiotic co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Pseudomonas putida***. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2015, **20**(6):1114-1122.
289. Riquelme CE, Ishida Y: **Interaction between microalgae and bacteria in coastal seawater**. *Memoirs of The College of Agriculture-Kyoto University (Japan)* 1989.
290. Bodilis J, Nsigure-Meilo S, Besaury L, Quillet L: **Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas***. *PloS one* 2012, **7**(4):e35647.
291. Arai H: **Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa***. *Frontiers in Microbiology* 2011, **2**:103.
292. Xu Z, Song L, Dai X, Chai X: **PHBV polymer supported denitrification system efficiently treated high nitrate concentration wastewater: Denitrification performance, microbial community structure evolution and key denitrifying bacteria**. *Chemosphere* 2018.
293. Dworkin M: **The Prokaryotes: Vol. 6: *Proteobacteria: Gamma Subclass***: Boston, USA Springer; 2006.
294. Di Capua C, Bortolotti A, Farías ME, Cortez N: **UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wetlands display high catalase activity**. *FEMS Microbiology Letters* 2011, **317**(2):181-189.
295. Ueda H, Otsuka S, Senoo K: **Community composition of bacteria co-cultivated with microalgae in non-axenic algal cultures**. *Microbiology and Culture Collections* 2009, **25**(1):21-25

Referencias

296. Allen MD, Garrett MK: **Bacteriological changes occurring during the culture of algae in the liquid phase of animal slurry.** *Journal of Applied Bacteriology* 1977, **42**(1):27-43..
297. Ye J, Song Z, Wang L, Zhu J: **Metagenomic analysis of microbiota structure evolution in phytoremediation of a swine lagoon wastewater.** *Bioresource Technology* 2016, **219**:439-444..
298. Liu H, Lu Q, Wang Q, Liu W, Wei Q, Ren H, Ming C, Min M, Chen P, Ruan R: **Isolation of a bacterial strain, *Acinetobacter* sp. from centrate wastewater and study of its cooperation with algae in nutrients removal.** *Bioresource Technology* 2017, **235**:59-69.
299. **National Center for Biotechnology Information.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Last access 02 jun 2019
300. Silva VL, Carvalho MAR, Nicoli JR, Farias LM: **Aerotolerance of human clinical isolates of *Prevotella* spp.** *Journal of Applied Microbiology* 2003, **94**(4):701-707.
301. Ayarza JM, Figuerola ELM, Erijman L: **Draft genome sequences of type strain *Sediminibacterium salmoneum* NJ-44 and *Sediminibacterium* sp. strain C3, a novel strain isolated from activated sludge.** *Genome Announcements* 2014, **2**(1):e01073-01013.
302. Wang ZB, Miao MS, Kong Q, Ni SQ: **Evaluation of microbial diversity of activated sludge in a municipal wastewater treatment plant of northern China by high-throughput sequencing technology.** *Desalination and Water Treatment* 2016, **57**(50):23516-23521.
303. González-Martínez A, Rodríguez-Sánchez A, Lotti T, García-Ruiz MJ, Osorio F, González-López J, Van Loosdrecht MCM: **Comparison of bacterial communities of conventional and A-stage activated sludge systems.** *Scientific Reports* 2016, **6**:18786.
304. Ju F, Zhang T: **Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant.** *The ISME Journal* 2015, **9**(3):683.